

**MIKROIONTOPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DIE WIRKUNG NEUTRALER
AMINOSÄUREN IM N. RUBER DER KATZE**

Herwig Altmann

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. K. Kramer, Prof. Dr. K. Thureau

MIKROIONTOPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG

NEUTRALER AMINOSÄUREN IM N. RUBER DER KATZE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Herwig Altmann

aus

München

1974



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. G. ten Bruggencate
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. K. Kramer
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	12. 3. 1974

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	6
2. <u>Material und Methoden</u>	12
2.1. Narkose und Überwachung.....	12
2.2. Operatives Vorgehen.....	12
2.3. Reizungen.....	13
2.4. Identifizierung des N. ruber.....	15
2.5. Mikroiontophorese.....	15
2.6. Herstellung der Iontophorese- elektroden.....	20
2.7. Registrierung.....	21
3. <u>Ergebnisse</u>	24
3.1. Wirkungen von GABA und Glycin; Vergleich ihrer relativen Wirkungsstärken.....	24
3.1.1. Intrazelluläre Messungen.....	24
3.1.1.1. Beeinflussung synaptischer und antidromer Potentiale.....	25
3.1.1.2. Beeinflussung des Membranpotentials.....	30
3.1.1.3. Beeinflussung der Membranleitfähigkeit.....	32

	Seite
3.1.2. Extrazelluläre Messungen.....	33
3.2. Wirkungen von GABA- und glycinähnlichen Aminosäuren.....	38
3.3. Wirkungen des Aminosäureblockers Picrotoxin.....	39
4. <u>Diskussion</u>	42
5. <u>Zusammenfassung</u>	57
6. <u>Literatur</u>	59

1. EINLEITUNG

Noch in der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts galt die Lehrmeinung, die Nervenzellen des Zentralnervensystems (ZNS) würden über ihre Fortsätze kontinuierlich ineinander übergehen und so ein engvermaschtes Netzwerk bilden (Reticulumtheorie nach GERLACH 1871). HIS (1886) und FOREL (1887) widersprachen zum ersten Male dieser Annahme und stellten fest, daß die einzelnen Nervenzellen morphologisch abgrenzbare, voneinander unabhängige Einheiten bilden, welche über ihre Fortsätze in engem Kontakt miteinander stehen. Nach WALDEYER (1891) wurde dieses Konzept als Neuronentheorie bezeichnet. 1897 prägte SHERRINGTON für die Stellen des engsten Kontaktes zwischen einzelnen Nervenzellen den Begriff Synapse. Mit der Verfeinerung der Technik der Lichtmikroskopie zu Beginn des 20. Jahrhunderts mehrten sich die Befunde, welche die Gültigkeit der Neuronentheorie erhärteten, bis schließlich mit der Einführung der Elektronenmikroskopie in den 50-iger Jahren endgültige Beweise für die morphologische Diskontinuität des ZNS geliefert wurden (Näheres bei ECCLES 1964).

Aus der Annahme der Neuronentheorie folgte natürlich die Frage, welche Mechanismen Information von der einen Nervenzelle auf eine nachgeschaltete Nervenzelle oder Effektorstruktur übertragen, oder, anders ausgedrückt, wie die morphologische Diskontinuität des ZNS funktionell überbrückt werde. Für das methodisch gut zugängliche periphere Nervensystem wurden schon

früh erste Hinweise erbracht, daß hier die Impulsübertragung auf chemischem Wege über die Freisetzung von Überträgerstoffen, auch Transmitter genannt, erfolgt. Pionierarbeit leistete hier LOEWI, der 1921 erstmals nachwies, daß der Vagusnerv das Herz über die Freisetzung eines chemischen Transmitters ("Vagusstoff") hemmt, dessen Eigenschaften ähnlich denen von Acetylcholin waren. CANNON und BAQ konnten 1931 zeigen, daß Reizung des Sympathikus zu der Freisetzung einer adrenalin-ähnlichen Substanz führt, die das Herz acceleriert. Die Untersuchungen von DALE und seinen Mitarbeitern führten 1936 zum Nachweis, daß Acetylcholin der Transmitter an der neuromuskulären Synapse ist. FELDBERG und GADDUM wiesen 1934 nach, daß Acetylcholin auch im sympathischen Ganglion als der chemische Überträgerstoff fungiert.

Konnte also für das periphere Nervensystem das Konzept der Übermittlung von Information durch chemische Transmitter als gesichert angesehen werden, so bestand noch längere Zeit eine heftig ausgetragene Kontroverse darüber, ob auch in den Synapsen des ZNS Erregung und Hemmung von Neuronen auf chemischem oder aber auf elektrischem Wege vermittelt werde. Plädierte FELDBERG 1945 für eine chemische Impulsübertragung auch im ZNS, wobei er an Acetylcholin als Transmitter dachte, so argumentierte ECCLES noch 1949 für eine ausschließlich elektrische Impulsübertragung im ZNS. Die Übertragung sollte demnach in elektrischen Synapsen erfolgen, im Sinne einer elektronischen Impulsüberleitung an aneinandergrenzenden Membranbezirken zweier Zellen mit niedrigem elektrischen Widerstand.

Erst genauere elektrophysiologische Analysen synaptischer Prozesse, durch die Einführung der Methode der Ableitung aus einzelnen Nervenzellen mit Mikroelektroden zu Beginn der 50-iger Jahre ermöglicht, führten dazu, daß das Konzept der chemischen Informationsübertragung als allgemeines Prinzip auch auf die Synapsen des ZNS der Säugetiere übertragen wurde. Die intrazellulär messbaren Korrelate der synaptischen Exzitation und Inhibition, nämlich eine vorübergehende Depolarisation der Membran (=excitatorisches postsynaptisches Potential, EPSP), bzw. eine vorübergehende Hyperpolarisation der Membran (=inhibitorisches postsynaptisches Potential, IPSP), sollen demnach auf folgende Art und Weise vermittelt werden (Übersicht bei ECCLES 1964): Die Depolarisation der präsynaptischen Nervenendigung durch das in der afferenten Faser geleitete Aktionspotential führt über einen im Detail noch unklaren Auslösemechanismus zu einer synchronen Freisetzung einer größeren Zahl von Transmittermolekülen in den synaptischen Spalt. Diese rufen, nach Diffusion durch den synaptischen Spalt und Reaktion mit postulierten Rezeptoren, an der subsynaptischen Membran des nachgeschalteten Neurons eine spezifische Zunahme der Ionenleitfähigkeit hervor. Das EPSP soll verursacht werden durch die Leitfähigkeitserhöhung der Membran für Kalium- sowie Natriumionen und den dadurch bedingten Nettoeinwärtsstrom von Kationen über den Membranwiderstand (COOMBS et al. 1955 c, ECCLES 1966). Grundlage des IPSP soll sein die Leitfähigkeitserhöhung der Membran hauptsächlich für Chloridionen und der dadurch bedingte Einwärtsstrom von Chlorid-

ionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten (s. Diskussion).

Auf der Suche nach der Identität der Überträgerstoffe des ZNS mehrten sich in den letzten Jahren Hinweise, daß den einfach gebauten Monocarboxyl- ω -Aminosäuren γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glycin eine Rolle als hemmende Transmitter zukommt. Mit der Methode der Mikroiontophorese (CURTIS 1964, nähere Erläuterung in Kap. 2.5.), die es erlaubt, geringe Mengen einer als Transmitter verdächtigten Substanz in die Nähe der untersuchten Neurone zu bringen, konnte in verschiedenen Regionen des ZNS gezeigt werden, daß diese beiden Aminosäuren in extrazellulären Messungen die Entladungsrate von Neuronen verminderten, und daß sie in intrazellulären Messungen die Membran der untersuchten Neurone hyperpolarisierten und ihre Leitfähigkeit erhöhten (KRNJEVIĆ und PHILLIS 1963, KRNJEVIĆ et al. 1966, KRNJEVIĆ und SCHWARTZ 1967 und 1968, OBATA et al. 1967 und 1970, CURTIS et al. 1968 b, WERMAN et al. 1968, CURTIS 1969, KRNJEVIĆ 1970, BRUGGENCATE und ENGBERG 1971). Die bei intrazellulärer Registrierung gefundenen Wirkungen entsprachen demnach der physiologischen postsynaptischen Hemmung von Neuronen, dem oben beschriebenen IPSP.

Vergleicht man die Ergebnisse mikroiontophoretischer Untersuchungen mit den hemmenden Aminosäuren GABA und Glycin in verschiedenen Gebieten des ZNS der Katze, so fällt auf, daß sich die relativen Wirkungsstärken dieser beiden Substanzen entlang der Neuroaxis gegensinnig verändern, gemessen am Vergleich der Iontophoreseströme (s. Kap. 2.5. und Diskussion). So

wirkt Glycin stärker als GABA an Motoneuronen des Rückenmarks (CURTIS et al. 1968 a und b, WERMAN et al. 1968), an Neuronen des N. hypoglossus (BRUGGENCATE und SONNHOF 1972) und an reticulären Neuronen des Hirnstamms (HÖSLI et al. 1969, HÖSLI und TEBECIS 1970, TEBECIS und DI MARIA 1972). Im N. cuneatus ist die Wirkungsstärke von Glycin und GABA etwa gleich groß (GALINDO et al. 1967). In höheren Regionen des ZNS jedoch übertrifft GABA die Wirkung von Glycin, z.B. an Neuronen des Deiters'schen Kerns (BRUGGENCATE und ENGBERG 1969 b und 1971, OBATA et al. 1970), des N. oculomotorius (OBATA und HIGHSTEIN 1970), sowie des cerebellären (KAWAMURA und PROVINI 1970) und cerebralen Cortex (KELLY und KRNJEVIĆ 1968, JOHNSON et al. 1970). Auch im Hippocampus (CURTIS et al. 1971 b) und Bulbus olfactorius (FELIX und McLENNAN 1971) war GABA stärker wirksam als Glycin.

Demgegenüber berichteten DAVIS und HUFMAN (1969) in einer Kurzmitteilung, daß Glycin in extrazellulären Messungen die Entladungsrate von Neuronen des N. ruber (RN) des Pavians stärker verminderte als GABA. Dieser Befund fällt aus dem Rahmen des Konzeptes einer systematischen Umverteilung des Verhältnisses der Wirkungsstärken von GABA und Glycin entlang der Neuroaxis. Es schien deshalb von Interesse, die relative Wirkungsstärke von mikroiontophoretisch appliziertem GABA und Glycin an Neuronen des roten Kerns der Katze eingehend anhand intra- wie extrazellulärer Messungen zu untersuchen. Darüberhinaus sollten intrazelluläre Ableitungen, die aus Neuronen des N. ruber (RN) bisher nicht vorlagen, genauere Aussagen auch

über den Wirkungsmechanismus dieser beiden hemmenden Aminosäuren an der Zellmembran möglich machen.

Der RN ist ein motorischer Kern des Mittelhirns, der aufgrund seiner afferenten und efferenten Verschaltung dem extrapyramidalmotorischen System zuzuordnen ist (Übersicht bei MASSION 1967). Histologisch läßt sich ein caudal gelegener makrozellulärer von einem rostral gelegenen parvozellulären Anteil trennen. Die relativ großen Neurone des makrozellulären Teils (Durchmesser 50 - 90 μ m) projizieren mit ihren efferenten Axonen unter anderem innerhalb des Tractus rubrospinalis auf die contralateralen Segmente des Rückenmarks. Afferent ist der makrozelluläre Teil des RN verbunden mit Groß- und Kleinhirn: Monosynaptische, erregende Afferenzen erhält er einerseits vom ipsilateralen sensomotorischen Cortex (TSUKAHARA und KOSAKA 1968), andererseits vom contralateralen N. interpositus (NIP) des Kleinhirns (TSUKAHARA et al. 1967). Über Kollateralen von Axonen der Pyramidenbahn gelangt z.T. monosynaptischer, erregender Zufluß (langsame Fasern der Pyramidenbahn), z.T. disynaptische Hemmung (schnelle Fasern der Pyramidenbahn) zum RN (TSUKAHARA et al. 1968).

An rubrospinalen Neuronen des RN wurde neben GABA und Glycin auch die Wirkung der iontophoretisch applizierten GABA- bzw. glycinähnlichen Aminosäuren δ -Aminovaleriansäure und ϵ -Aminocapronsäure bzw. β -Alanin (CURTIS et al. 1968 a) untersucht. Die Interaktion des als GABA-Blocker anzusehenden Alkaloids Picrotoxin (s. Diskussion) mit GABA wurde mikroiontophoretisch in einigen der Versuche studiert.

2. MATERIAL UND METHODEN

Die Versuche wurden an 25 Katzen (2,0 - 3,2 kg) durchgeführt.

2.1. Narkose und Überwachung

Die Tiere wurden zu Beginn der Experimente mit Halothan^R betäubt, und, nachdem eine Trachealkanüle gelegt worden war, mit Äther unter zeitweiliger Halothanbeimengung weiter narkotisiert. Am Ende des operativen Teils wurde auf Chloralose (30 - 50 mg/kg) oder Nembutal^R (30 - 40 mg/kg) übergegangen. Arteria und vena femoralis wurden katheterisiert. Ein Druckaufnehmer (Statham) mit Verstärker (Hellige) registrierten fortlaufend den arteriellen Druck. Ein Absinken des arteriellen Drucks unter 80 mmHg verhinderte notfalls die Verabreichung geringer Mengen Arterenols^R. Vor Beginn der elektrophysiologischen Messungen wurden die Tiere mit Pancuronium^R relaxiert und künstlich beatmet. Die endexpiratorische CO₂-Konzentration der Atemluft wurde fortlaufend gemessen (URAS MT der Fa. Hartmann und Braun) und auf etwa 4 % konstant gehalten. Wärmezufuhr aus einer Quarzlampe hielt die Temperatur der Versuchstiere um 37 - 38°C.

2.2. Operatives Vorgehen

In der ersten Hälfte der Versuche wurde der Zugang zum RN von dorsal geschaffen. Der Schädel wurde in einem Kopfhalter so fixiert, daß beliebige Koordinaten stereotaktisch aufgesucht

werden konnten. Nach Trepanation der Schädelkalotte wurde die Dura mater entfernt und ein Teil des Occipitallappens sowie der Hippocampus bis auf das Niveau der Vierhügelplatte abgesaugt. Der sensomotorische Cortex, Teile des Kleinhirns und die Rückenmarkssegmente C_3 und L_1-L_3 mußten freigelegt werden, um Reizelektroden anbringen zu können (Übersicht in Abb. 1). Die freigelegten Gebiete von Gehirn und Rückenmark wurden durch die Überschichtung mit auf Körpertemperatur erwärmtem Paraffin vor Austrocknung geschützt.

Bei dem beschriebenen dorsalen Zugang zum RN war das Risiko von schwer stillbaren Blutungen groß; ein Zugang von ventral in der zweiten Hälfte der Versuche verminderte dieses Risiko (s. Abb. 1). Hierzu wurden Trachea und Oesophagus über der Schädelbasis und den ersten beiden Cervicalwirbeln freigelegt und entfernt. Danach wurde zwischen den Bullae tympanicae die Schädelbasis trepaniert.

2.3. Reizungen

Zur bipolaren Reizung des Rückenmarks (antidrome Identifizierung, s. Kap. 2.4.) in Höhe der Segmente C_3 und L_2 wurden herkömmliche Silberballelektroden beiderseits angelegt. Der contralaterale Nucleus interpositus und der ipsilaterale sensomotorische Cortex wurden monopolar mit glasisolierten Wolframelektroden gereizt (Schematischer Überblick in Abb. 1). Ihr Spitzendurchmesser betrug etwa $3 - 5 \mu m$, der Widerstand (gemessen mit kurzen Rechteckstimpulsen) etwa $20 - 50 K\Omega$. Zur Herstellung wurde Wolframdraht ($0,5 \text{ mm } \varnothing$) zunächst in einem

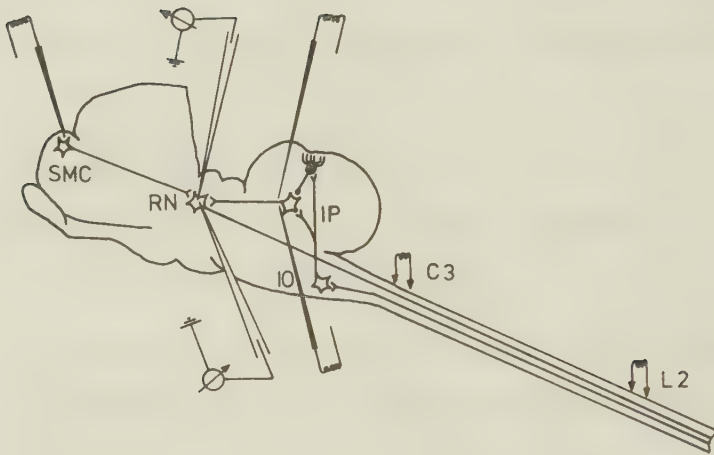


Abb. 1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

Ableitung und Mikroiontophorese im N. ruber (RN). Reizung des ipsilateralen sensomotorischen Cortex (SMC) und des contralateralen N. interpositus (IP) führt zu monosynaptischen EPSPs in Zellen des RN. Reizung des Rückenmarks auf Höhe der Segmente C₃ und L₂ erregt die Axone rubrospinaler Neurone antidrom, aber auch ascendierende Fasern, deren orthodrome Aktivierung, z.B. über die untere Olive (IO) und den N. interpositus, Neurone des RN polysynaptisch erregt. Über kollaterale Aktivierung von Purkinjezellen des Kleinhirns und deren hemmende Verschaltung mit Neuronen des N. interpositus kann darauf eine indirekte Hemmung (=Disfacilitierung) des RN folgen (vgl. Abb. 9).

Bereich von etwa 2 cm elektrolytisch zugespitzt, und danach in ein Glasröhrchen (1,5 mm Ø) gesteckt. In einem Elektrodenziehgerät wurde das Glasröhrchen mit dem Wolframdraht eingespannt, das Glas in einer Heizschlinge erhitzt und über die Spitze des Wolframdrahtes ausgezogen. Die Spitze des Glasüberzuges wurde danach manuell so entfernt, daß etwa 500 µm des Wolframdrahtes freilagen. Ihre endgültige Form bekam die Elektrodenspitze dann durch erneute elektrolytische Zuspitzung unter mikroskopischer Sicht.

Der contralaterale Nucleus interpositus (NIP) wurde stereotaktisch aufgesucht, die optimale Lage der Reizelektrode anhand der Amplitude und Schwelle des durch Reizung im Gebiet des NIP im RN hervorgerufenen Feldpotentials kontrolliert.

2.4. Identifizierung des RN

Zur Identifizierung des Roten Kerns diente während der Versuche das im RN ableitbare antidrome Feldpotential, das durch die relativ synchrone antidrome Invasion von RN-Neuronen nach Reizung des rubrospinalen Traktes im Rückenmark zustande kommt. Nach Versuchsende wurde in einigen Experimenten die Ableitelektrode steckengelassen, das Gehirn mit 4 %-iger Formalinlösung fixiert und die Lage der Elektroden sodann histologisch überprüft.

2.5. Mikroiontophorese

Einen wesentlichen Fortschritt in der Untersuchung der Wirkung von möglichen Transmittersubstanzen auf einzelne Neurone und ihres Wirkungsmechanismus an der Zellmembran brachte die An-

wendung der Technik der Mikroiontophorese (CURTIS 1964) im ZNS (s. Einleitung). Auch bei den vorliegenden Untersuchungen am RN wurde diese Mikromethode angewandt. Sie erlaubt es, wässrig gelöste Substanzen in ionisierter Form aus Mikropipetten in die unmittelbare Nähe von einzelnen Nervenzellen zu bringen, während deren Aktivität entweder intra- oder extrazellulär über eine mit den Mikropipetten verbundene Ableit-elektrode registriert wird. Gegenüber der systemischen oder topischen Verabreichung von zu untersuchenden Substanzen birgt diese Methode wesentliche Vorteile: Größere Diffusionsbarrieren, wie die Blut-Hirnschranke werden umgangen. Die Wahrscheinlichkeit, daß negative Ergebnisse zustandekommen durch einen enzymatischen Abbau der zu testenden Stoffe auf ihrem Weg zum untersuchten Neuron ist wesentlich geringer. Durch die Beschränkung der Angriffsstellen der iontophoretisch eingebrachten Substanzen auf die unmittelbare Umgebung des getesteten Neurons kommen deren Effekte mit größerer Wahrscheinlichkeit nicht indirekt, über die Einwirkung auf vorgeschaltete Nervenzellen, zustande.

Prinzipiell bedient sich die Technik der Mikroiontophorese des Phänomens der Wanderung elektrisch geladener Teilchen im elektrischen Feld (Iontophorese): Aus den Mikropipetten werden die wässrig gelösten, ionisierten Substanzen ausgetrieben durch das Anlegen eines Gleichstroms (Iontophoresestrom), dessen Polarität sich nach der Art der Ionen richtet. Iontophoresestrom und Menge an freigesetzter Substanz sind über die Transportzahl (s. Diskussion) proportional zu-

einander (KRNJEVIĆ et al. 1963). Ist eine Substanz mikro-
iontophoretisch in die Nähe eines Neurons gebracht worden, so
wird sie ihre Wirkungsstellen an der Zellmembran durch Dif-
fusion erreichen. Ihre Konzentration an der Zellmembran wird
abhängen von dem Ausmaß des Iontophoresestroms und von der
Entfernung der Spitze der Iontophoresekapillaren von den An-
griffsstellen der Substanz an der Zelle; weiterhin vom Aus-
maß eines möglichen enzymatischen Abbaus während der Diffusion
und von möglichen Diffusionsbarrieren (z.B. Gliazellen). Von
diesen Variablen ist allein der Iontophoresestrom exakt be-
stimmbar. Es ist deshalb üblich, als indirektes, relatives
Maß der lokalen Konzentrationen der Substanzen an der Zell-
membran die Iontophoreseströme heranzuziehen (s. Diskussion).
Aus diesem Grunde basieren auch in dieser Arbeit die Verglei-
che der Wirkungsstärken der im RN untersuchten Aminosäuren
auf dem Vergleich der zu ihrer Freisetzung verwandten Ionto-
phoreseströme.

Die anatomische Lage des RN stellte besondere Voraus-
setzungen an die Iontophoreseelektroden: Sie mußten relativ
lang und schlank sein, damit es bei der tiefen Lage des RN
(etwa 1 cm unter der Oberfläche der Vierhügelplatte) nicht zu
Druckschädigung im Gebiet des RN kam. Dazu wurden Iontopho-
reseelektroden vom sog. koaxialen Typ konstruiert (s. Abb. 2):
Ein Kranz von 5 aneinander verschmolzenen Iontophoresekapil-
laren von 5 - 6 μ m äußerem Gesamtspitzendurchmesser (Mehr-
fachelektrode) umgibt die innere Ableitelektrode, die um
40 - 70 μ m über die Öffnungen der Iontophoresekapillaren vor-

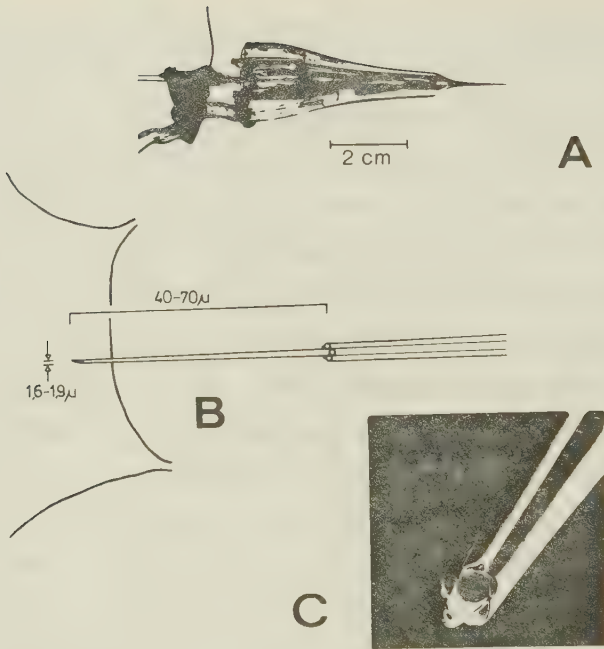


Abb. 2: Darstellung der zur Mikroiontophorese verwendeten Elektroden vom coaxialen Typ

A: Gesamtaufnahme der Iontophoreseelektrode. Die Ableitelektrode steckt im Zentralkanal der 5 aneinander verschweißten, sie ringförmig umschließenden Iontophoresepipetten (Mehrfachelektrode). Beide Elektroden sind am Schaft miteinander verklebt.

B: Schematische Abbildung der Spitze der Iontophoreseelektrode. Die durch den Zentralkanal der Mehrfachelektrode vorgeschobene Ableitelektrode überragt die Öffnungen der Iontophoresepipetten um 40 - 70 μm . Die Spitze der Ableitelektrode ist schräg auf einen Durchmesser von 1,6 - 1,9 μm angeschliffen.

C: Elektronenoptische Aufnahme der Mehrfachelektrode vor dem Einbau der Ableitelektrode. Äußerer Durchmesser 6 μm . Deutlich sichtbar die einzelnen Öffnungen der 5 verschweißten Iontophoresepipetten und der, später die Ableitelektrode aufnehmende, Zentralkanal.

geschoben ist. Der Spitzendurchmesser der Ableitelektrode betrug zwischen 1,5 und 1,9 μm , ihr Widerstand zwischen 5 und 15 M Ω . Die Füllung bestand aus dem Gemisch einer 2 molaren Kaliumcitratlösung mit 10 % 2 molarer Kaliumchloridlösung. Diese komplexen Elektroden ermöglichten die intra- aber auch extrazelluläre Registrierung der Wirkungen von Substanzen, die aus den einzelnen Kapillaren der Mehrfachelektrode iontophoretisch freigesetzt wurden.

Folgende Substanzen wurden zur Iontophorese verwendet: NaCl (165 mM) zur Kontrolle von evtl. Stromeffekten, 0,5 molare Lösungen von GABA (pH 4,5), Glycin (pH 3,5), δ -amino-Valeriansäure (AVA) (pH 5,5), β -Alanin (pH 3,5), ϵ -amino-Capronsäure (ACA) (pH 5). Der pH wurde mit 1 n HCl eingestellt. Nimmt man den pK_1 von Glycin mit 2,35 und den von GABA mit 4,2 an, so ist ersichtlich, daß bei den angegebenen pH-Werten beide Substanzen zum Teil als Kationen in der Lösung vorlagen und somit mit kationischem Strom appliziert werden konnten. Weiterhin wurde Picrotoxin, gesättigt in 165 mM NaCl, angewandt. Der Widerstand der mit diesen Stoffen gefüllten Iontophoresepipetten betrug 20 - 150 M Ω .

Mit Hilfe einer 4 Kanal-Iontophoreseeinheit war es möglich konstante Ströme von 5 - 450 nA durch die Iontophoresekapillaren zu schicken. Die Ströme konnten stufenweise erhöht werden (15 - 20 % Zunahme von einer zur nächst höheren Stufe, 26 Stufen). Ein in Serie geschaltetes Amperemeter diente der Kontrolle des Stromflusses. An jedem Kanal konnte ein Rückhalttestrom von 0 - 15 V in entgegengesetzter Rich-

tung zum Iontophoresestrom angelegt werden, der eine unkontrollierte Diffusion der Substanzen aus den Kapillaren unterdrücken sollte.

2.6. Herstellung der Iontophoreseelektroden

Äußere Mehrfachelektrode zur Iontophorese: In einer Gas-Pressluftflamme wurden 5 cm lange Stücke von Pyrexglasröhrchen (8 mm äußerer, 6 mm innerer Durchmesser) längsseits so aneinander verschmolzen, daß sie einen Zylinder bildeten. Die Mitte dieses Zylinders wurde in einer Gas-Sauerstoffflamme erhitzt und auf einen Gesamtdurchmesser von etwa 5 - 6 mm ausgezogen. In einem herkömmlichen Vertikalziehgerät wurde dann dieser Rohling nochmals um 20 - 30 mm dünn ausgezogen und danach seine Spitze auf 5 - 6 μ m Durchmesser plan abgebrochen, so daß die Öffnungen der 5 Kapillaren in einer Ebene lagen. Eine elektronenoptische Aufnahme der Spitze der auf diese Weise hergestellten Mehrfachelektrode ist in Abb. 2 C zu sehen.

Innere Elektrode zur Ableitung: Pyrexglaskapillaren von 1,5 mm äußerem und 0,9 mm innerem Durchmesser wurden in einem Horizontalziehgerät um 25 - 35 mm ausgezogen, danach mit Gold bedampft (s. unten) und auf einer Diamant-Schleifmaschine auf einen Spitzendurchmesser von 1,5 - 1,9 μ m schräg abgeschliffen, wobei sich meistens der Goldbelag bis auf 30 - 50 μ m löste.

Justieren der Elektroden: Ableit- und Mehrfachelektrode wurden in zwei voneinander unabhängige Mikromanipulatoren eingespannt

und koaxial hintereinander ausgerichtet. Die Ableitelektrode wurde dann unter mikroskopischer Überwachung durch den Zentralkanal der Mehrfachelektrode soweit vorgeschoben, bis ihre Spitze um 30 - 70 μ m hervorragte. In dieser Position wurden beide Elektroden mit einem Schnellklebstoff (X-60, Hottinger Baldwin Meßtechnik) fest aneinander fixiert (s. Abb. 2 A und B).

Goldbeschichtung der Ableitelektrode zur Kapazitätsneutralisierung: Ableitelektroden in Iontophoreseelektroden des koaxialen Typs besitzen eine hohe Kapazität. Dadurch wird ihre Zeitkonstante ($R \times C$) zu hoch, um die hochfrequenten Wechselstromsignale der elektrischen Vorgänge an Nervenzellen adäquat aufnehmen zu können. Der Kapazitätsrückkopplungsstromkreis des verwandten Kathodenfolgers reichte zu einer Neutralisierung dieser hohen Kapazität nicht aus. Aus diesem Grunde wurde durch Bedampfung in einer Hochvakuumanlage (10^{-5} Torr, Leybold-Heraeus) eine dünne Goldschicht auf die Ableitelektroden aufgebracht. Diese Goldschicht wurde über eine wählbare Kapazität (50 - 100 nF) mit dem Gehäuse des Eingangsverstärkers verbunden, wodurch die Zeitkonstante der Elektroden auf ein adäquate Messungen ermöglichendes Maß reduziert werden konnte (Näheres bei SONNHOF 1973).

2.7. Registrierung

Die von der Ableitelektrode intra- oder extrazellulär aufgenommenen Potentiale wurden einem Kathodenfolger (EIDE 1968) zugeführt. Mit dieser Kathodenfolgereinheit konnten auch kon-

stante Ströme, entweder als Gleichströme, oder als Rechteckstrompulse durch die Ableitelektrode geschickt werden. Der Output des Kathodenfolgers wurde einerseits zwei Oscilloscopen (Tektronix 5030, 3dB bei 2 Hz) zur Wechselstromregistrierung schneller Signale, andererseits einem Mingograf 800 (Siemens) zur fortlaufenden Gleichstromregistrierung des Membranpotentials bei intrazellulären Messungen zugeführt. Von den Oscilloscopen konnte mit einer Grass C-4 Kamera photographiert werden.

Bei Messungen der Effekte von Drogen auf extrazellulär aufgenommenen Feldpotentiale wurde der Output eines der Oscilloscope einem DIDAC 800 Kleincomputer (Intertechnique) zugeführt, und über zumeist 35 - 40 Einzelmessungen gemittelt. Die Feldpotentiale ohne Drogeneinwirkung wurden als Kontrolle aufgenommen und in einer der 4 Untergruppen des Gedächtnisses (je 200 Adressen) gespeichert. Unter der Einwirkung einer Testsubstanz wurde wiederum gemittelt, und das Feldpotential in der nächsten Untergruppe gespeichert. Die dritte Untergruppe wurde danach zur erneuten Kontrollmessung benutzt (z.T. unter NaCl zur Stromkontrolle), welche mit der ersten Kontrollmessung identisch sein mußte ($\pm 5\%$). War dies der Fall, wurde diese Messung gelöscht und durch die Mittelung des Feldpotentials unter der Einwirkung einer anderen Aminosäure ersetzt. Anschließend wurde eine letzte Kontrollmitteilung durchgeführt, in der 4. Untergruppe gespeichert und mit der ersten Kontrolle verglichen. Die in dieser Weise gespeicherten Messungen konnten auf eines der beiden Oscillos-

cope übertragen und von dort photographiert werden. Nur solche Messungen wurden verwandt, bei denen die erste mit der letzten Kontrolle identisch war.

3. ERGEBNISSE

In 25 Versuchen konnte aus 72 als rubrospinal identifizierten Neuronen intrazellulär abgeleitet und gleichzeitig die Wirkung von extrazellulär mikroiontophoretisch freigesetzten, neutralen Aminosäuren untersucht werden.

Mikroiontophoretische Messungen bereiten an so tiefgelegenen Strukturen wie dem RN (notwendige Penetrationstiefe 10 mm) einige Schwierigkeiten. Zunächst ist die Gefahr des Abbrechens der Elektrodenspitze groß, zumal reichlich Blutgefäße den Weg der Elektrode kreuzen. Weiterhin ist die Möglichkeit des Verstopfens von Ableit- und Iontophoresekapillaren erhöht, und schließlich übt die Mehrfachelektrode beim Vordringen im Hirngewebe immer etwas Druck auf darunter gelegene Strukturen aus. Demzufolge konnte aus RN-Neuronen selten länger als 10-15 Minuten abgeleitet werden, das Membranpotential zeigte häufig die Tendenz sich stetig zu verringern.

Neben den intrazellulären Ableitungen wurde in 16 Experimenten eine Vielzahl von Messungen der Einwirkung von neutralen Aminosäuren auf die Form extrazellulär registrierter Feldpotentiale vorgenommen.

3.1. Wirkungen von GABA und Glycin; Vergleich ihrer relativen Wirkungsstärke

3.1.1. Intrazelluläre Messungen

Hinweise auf den Wirkungsmechanismus der als hemmende Trans-

mitter in Frage kommenden Substanzen an der Zellmembran von RN-Neuronen ergaben intrazelluläre Messungen. Dabei wurden die Effekte der iontophoretisch applizierten Substanzen auf die Amplitude synaptisch und antidrom ausgelöster Potentiale, auf das Membranpotential (Polarisation) und auf die Leitfähigkeit der Zellmembran untersucht.

3.1.1.1. Beeinflussung synaptischer und antidromer Potentiale

Excitatorische postsynaptische Potentiale, die monosynaptisch übertragen werden, lassen sich in Neuronen des RN erstens nach Reizung des contralateralen NIP und zweitens nach Reizung des ipsilateralen sensomotorischen Cortex hervorrufen (TSUKAHARA et al. 1967, TSUKAHARA und KOSAKA 1968). Polysynaptische EPSPs zeigen sich nach Reizung von aufsteigenden Bahnen des Rückenmarks (TOYAMA et al. 1967).

In insgesamt 19 rubrospinalen Neuronen wurde der Einfluß von GABA und Glycin auf einzelne dieser synaptischen Potentiale untersucht. Die Amplituden aller drei Typen von EPSPs wurden sowohl von GABA wie auch von Glycin reduziert. Ein Vergleich der relativen Wirkungsstärken dieser beiden Aminosäuren auf der Basis etwa gleicher Iontophoreseströme zeigte jedoch eine eindeutig stärkere Empfindlichkeit aller dieser excitatorischen Potentiale gegenüber GABA als gegenüber Glycin.

In Abb. 3 A ist die Wirkung von GABA, mit 48 nA appliziert, auf ein durch NIP-Reizung hervorgerufenen monosynaptischen EPSP dargestellt. Jede Einzelabbildung zeigt dabei

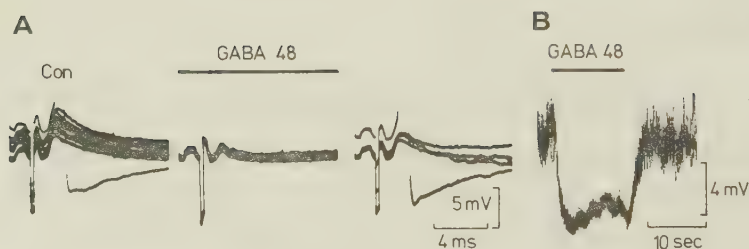


Abb. 3: Wirkung von GABA auf synaptische Potentiale und das Membranpotential eines RN-Neurons

A: Wirkung von GABA (48 nA) auf synaptische Potentiale (Reizung des contralateralen N. interpositus mit 300 nA) eines RN-Neurons. Übereinanderprojizierte Oscilloscoppdurchläufe (Wechselstromregistrierung), vor, während und nach der GABA-Applikation aufgenommen (Durchläufe unter GABA-Einwirkung durch Balken markiert).

B: Wirkung von GABA (48 nA) auf das gleichzeitig fortlaufend mitgeschriebene Membranpotential (Gleichstromregistrierung) desselben Neurons.

Hier, wie in den folgenden Abbildungen Positivität nach oben.

mehrere Oscilloscopedurchläufe. Zu Beginn jeden Durchlaufs erscheint ein Elektrodentestpuls, gefolgt vom Reizartefakt und daran anschließend das synaptische Potential. Während in der Kontrollmessung (links) das RN-Neuron in einem der Durchläufe überschwellig erregt wird (das resultierende Aktionspotential ist wegen der gewählten Vergrößerung nur in der Anstiegs- und Abfallsflanke, sowie Nachhyperpolarisation dargestellt), wird unter GABA die Amplitude des EPSP deutlich verringert, die Zelle kann kein Aktionspotential mehr generieren, ist also gehemmt. Daß dieser Vorgang reversibel ist zeigt die erneute Kontrollmessung nach GABA (rechts): Nach dem Ausschalten des Iontophoresestroms vergrößert sich die Amplitude des EPSP wieder auf Kontrollwerte, das Neuron wird z.T. wieder überschwellig erregt. Die Reizstärke der NIP-Reizung ($300 \mu\text{A}$) ist während der gesamten Messung nicht verändert worden.

Abb. 3 B zeigt die Wirkung von GABA (48 nA) auf das gleichzeitig fortlaufend mitgeschriebene Membranpotential dieser Zelle (Gleichstromregistrierung mit langsamer Zeitschreibung): GABA hyperpolarisiert um etwa 7 mV. Die Auslenkungen der Grundlinie sind bedingt durch die reizinduzierten EPSPs; entsprechend den Befunden aus Abb. 3 A sind deren Amplituden während der GABA-Applikation deutlich verringert.

Fasern des rubrospinalen Trakts werden durch Reizung des Rückenmarks erregt. Die am Reizort ausgelösten Aktionspotentiale werden antidrom zum RN geleitet und rufen in rubrospinalen Neuronen ein sog. antidromes Aktionspotential hervor. Bei intrazellulärer Messung zeigt es einen typischen zeitli-

chen Verlauf (s. Abb. 4), dessen einzelne Komponenten der nacheinander erfolgenden Entladung von verschiedenen Membranabschnitten des Neurons zuzuordnen sind (COOMBS, ECCLES und FATT 1955 a, NELSON und FRANK 1964). ECCLES wies 1955 nach, daß Hyperpolarisation eines Motoneurons die drei Einzelkomponenten des antidromen Aktionspotentials deutlicher hervortreten läßt: Bei zunehmender Hyperpolarisation fällt zuerst die Aktivierung der Soma-Dendritenmembran (SD-Spike) des Neurons aus. Es resultiert der sog. IS-Spike (Entladung des Initialsegments). Bei weiter zunehmender Hyperpolarisation kann es zur völligen Blockierung der Zellinvasion und damit zum Auftauchen des M-Spikes (Entladung des myelinisierten Axons) kommen.

Abb. 4 A und B demonstrieren den Effekt von mit etwa gleichen Strömen appliziertem GABA und Glycin auf das antidrome Aktionspotential einer RN-Zelle. In A blockiert GABA (52 nA) die soma-dendritische Komponente des antidromen Aktionspotentials und reduziert darüber hinaus die Amplitude des übrigen IS-Spikes. Im Vergleich dazu vermag Glycin in B trotz höheren Iontophoresestroms (60 nA) nur verzögert und inkonstant die Überleitung der Erregung vom Initialsegment auf die soma-dendritische Membran zu unterdrücken. Zugrunde liegen dürfte dieser Hemmung des antidromen Aktionspotentials neben der Hyperpolarisation der Membran (vgl. Abb. 3 B, 5 A und 5B) noch eine Zunahme der Membranleitfähigkeit (vgl. Abb. 5 C, 5 D und Diskussion). Auch bei vergleichenden Messungen der hemmenden Wirkung von GABA und Glycin auf das antidrome

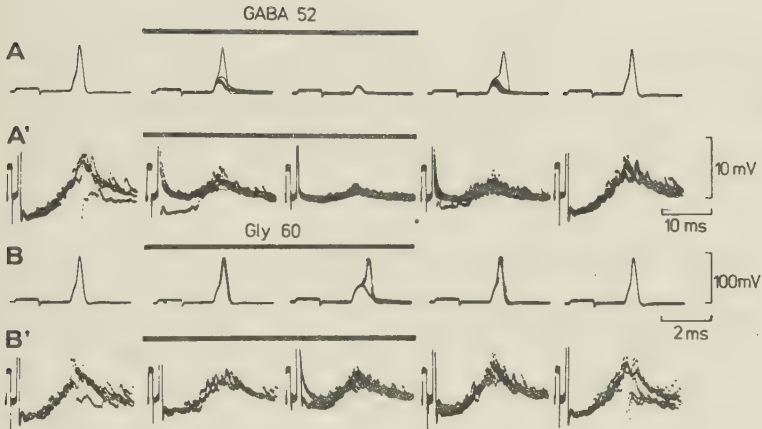


Abb. 4: Wirkungen von GABA und Glycin auf antidrome und post-synaptische Potentiale eines RN-Neurons

A und B: Wirkung von GABA (52 nA) bzw. Glycin (60 nA) auf ein antidrom ausgelöstes Aktionspotential (Reizung des Rückenmarks bei C_2). Übereinanderprojizierte, schnelle Oscilloscoppdurchläufe (Wechselstromregistrierung), Kalibrierungspuls zu Beginn der Durchläufe: 5 mV, 1 msec; die Applikation der Aminosäuren ist durch Balken markiert.

A' und B': Wirkung von GABA (52 nA) bzw. Glycin (60 nA) auf späte, polysynaptische EPSPs. Übereinanderprojizierte Oscilloscoppdurchläufe, zum selben Zeitpunkt aufgenommen wie in A und B, jedoch mit langsamerer Zeitablenkung und höherer Verstärkung.

Aktionspotential in weiteren 9 RN-Zellen zeigte sich GABA deutlich wirksamer als Glycin.

In Abb. 4 A' und B' ist dieselbe Ableitung mit höherer Verstärkung und langsamer Zeitablenkung abgebildet. Die dabei sichtbar werdenden, auf den antidromen Spike folgenden, polysynaptischen EPSPs reduziert GABA (52 nA) ebenfalls deutlich stärker als es Glycin (60 nA) vermag.

3.1.1.2. Beeinflussung des Membranpotentials

KRNJEVIĆ und SCHWARTZ konnten 1967 den hyperpolarisierenden Effekt iontophoretisch applizierten GABAs auf das Membranpotential von corticalen Zellen zeigen. WERMAN et al. (1968) und CURTIS et al. (1968 b) wiesen eine Hyperpolarisation durch Glycin am Motoneuron des Rückenmarks nach. In einer Reihe weiterer iontophoretischer Untersuchungen an verschiedenen Zellsubstraten des ZNS konnte eine hyperpolarisierende Wirkung von GABA und Glycin nachgewiesen werden (s. Diskussion).

Diese Befunde konnten an Zellen des RN bestätigt werden: Sowohl GABA wie Glycin führten zu einer Hyperpolarisation des Membranpotentials. Bei Anwendung gleicher Iontophoreseströme zeigte sich, daß in 35 von 38 getesteten RN-Zellen die GABA-induzierte hyperpolarisierende Membranpotentialauslenkung deutlich größer war als die durch Glycin induzierte, manchmal sogar das Doppelte betrug. Dies zeigen auch Abb. 5 A und B; das Membranpotential dieser RN-Zelle wurde in fortlaufender Gleichstromregistrierung aufgezeichnet. GABA (52 nA) hyperpolarisiert die Membran dabei um maximal 7 mV, Glycin (56 nA)

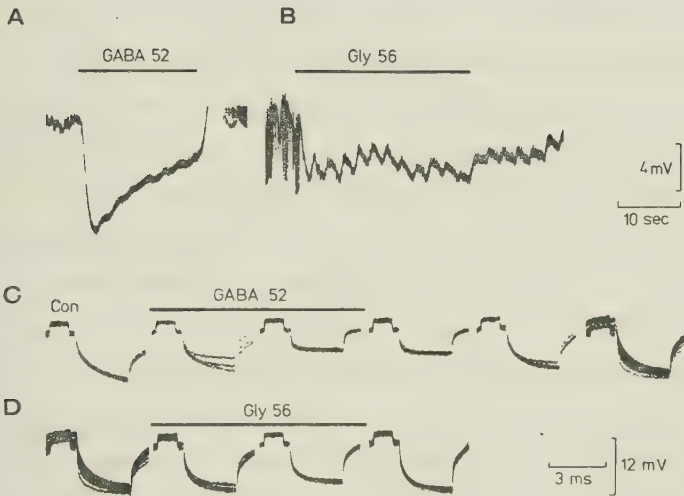


Abb. 5: Wirkungen von GABA und Glycin auf das Membranpotential und die Membranleitfähigkeit einer RN-Zelle

A und B: Ausschnitte aus der fortlaufenden Registrierung des Membranpotentials (Gleichstromregistrierung), Vergleich der Hyperpolarisation durch GABA (52 nA) und durch Glycin (56 nA). Applikation der Aminosäuren durch Balken markiert.

C und D: Gleichzeitige Messung der Membranleitfähigkeit durch die Injektion kurzer, konstanter, hyperpolarisierender Strompulse (8 nA) über die Ableitelektrode (der Spannungssprung über den Elektrodenwiderstand ist kompensiert). Übereinanderprojizierte Oscilloscopedurchläufe (Wechselstromregistrierung), vor, während und nach der Applikation der Aminosäuren (durch Balken markiert) aufgenommen; zu Beginn jeden Durchlaufs ein Kalibrierungspuls (2 mV, 1 msec), gefolgt von dem durch den Strompuls hervorgerufenen Spannungssprung über den Membranwiderstand.

dagegen nur um maximal 3,5 mV. Die Zelle begann zwischen der GABA- und Glycinapplikation spontan zu feuern, deshalb die starke Instabilität des Membranpotentials vor Beginn der Glycinmessung; Glycin unterdrückt dann die Entstehung dieser spontanen Aktionspotentiale.

Unterschiede fanden sich auch im Zeitgang der hyperpolarisatorischen Effekte: Der Abfall des Membranpotentials bis zum Maximum der Hyperpolarisation war unter GABA meist steiler als unter Glycin (vgl. Abb. 5 A und B). Die in Abb. 5 A festzustellende Tendenz der Hyperpolarisation, sich noch während der GABA-Applikation in ihrer Amplitude zu verringern, war häufig, aber mit unterschiedlichem Ausmaß zu beobachten. Sie war unter dem Einfluß von GABA meist stärker ausgeprägt als unter Glycin.

3.1.1.3. Beeinflussung der Membranleitfähigkeit

Um die Effekte von GABA und Glycin auf die Membranleitfähigkeit von Neuronen des RN zu untersuchen, wurden kurze, hyperpolarisierende Pulse konstanten Stroms (5 - 20 nA) über die intrazelluläre Ableitelektrode durch die Zellmembran geschickt. Nach Kompensation des durch den Elektrodenwiderstand bedingten Spannungsabfalls ist die Amplitude des registrierbaren Spannungssprungs Ausdruck des Widerstands der Zellmembran. Sein Zeitgang wird durch die Zeitkonstante der Membran bestimmt ($R \times C$). Eine Verringerung der Amplitude des Spannungssprungs entspricht also einer Abnahme des Membranwiderstands, d.h. einer Zunahme der Membranleitfähigkeit.

Sowohl GABA wie Glycin erhöhten die Membranleitfähigkeit von 10, auf diese Weise untersuchten RN-Neuronen. Auch hier übertraf die durch GABA hervorgerufene Leitfähigkeitszunahme jene unter Glycin, wenn die Wirkungen von mit gleichen Strömen eingebrachten Dosen verglichen wurden.

Abb. 5 C und D illustrieren den Effekt von GABA (52 nA) bzw. Glycin (65 nA) auf die Leitfähigkeit der Zellmembran eines RN-Neurons, wobei wieder mehrere Oscilloscopedurchläufe übereinander projiziert wurden (selbe Zelle wie in Abb. 5 A und B). GABA verringert die Amplitude des Spannungssprungs über die Membran (konstanter Strompuls 8 nA) um etwa 50 %, Glycin dagegen nur um etwa 20 %. Rechnerisch läßt sich eine Reduktion des Membranwiderstandes von 1,5 M Ω auf etwa 0,7 M Ω unter dem Einfluß von GABA, unter dem von Glycin auf etwa 1,2 M Ω ermitteln.

Die in Abb. 5 A dargestellte stärkere Hyperpolarisation der Zelle durch GABA als durch Glycin (Abb. 5 B), ist also begleitet von einer entsprechend stärkeren Erhöhung ihrer Membranleitfähigkeit (s. Diskussion).

3.1.2. Extrazelluläre Messungen

Reizung des Rückenmarks und des contralateralen NIP rufen im Gebiet des RN extrazellulär registrierbare Feldpotentiale hervor. Sie entstehen einerseits durch eine synchrone antidrome Aktivierung der Neurone des RN (antidromes Feldpotential), andererseits durch ihre synchrone monosynaptische Aktivierung (synaptisches Feldpotential, vgl. TSUKAHARA et al. 1967). In

die Messung von Feldpotentialen gehen die Aktivitäten mehrerer RN-Zellen ein. Die Effekte, die iontophoretisch eingebrachte Substanzen an diesen Feldpotentialen zeigen, sind also Summationseffekte, zusammengesetzt aus den Einzelwirkungen an einzelnen RN-Neuronen.

Die hemmende Wirkung von iontophoretisch applizierten Aminosäuren am Feldpotential zu untersuchen, bot einen gewissen Vorteil: Da die Messbedingungen im Vergleich zu intrazellulären Messungen wesentlich konstanter waren, konnten die relativen Wirkungsstärken von GABA und Glycin über längere Zeit eingehend untersucht werden. Genauere quantitative Aussagen in Form von Dosiswirkungskurven waren dadurch möglich.

Abb. 6 zeigt Dosiswirkungskurven von GABA und Glycin, gemessen an einem antidromen Feldpotential (geschlossene Symbole) und an einem synaptischen Feldpotential (offene Symbole) im RN. Auf der Abszisse die Iontophoreseströme in logarithmischer Auftragung, auf der Ordinate die Amplitude der Feldpotentiale, in % der Kontrollamplituden ohne Drogenwirkung. Jeder Punkt der Kurven stellt einen gemittelten Wert aus 40 Einzelmessungen dar. Es wurde darauf geachtet, daß sich die Amplitude der Kontrollmessung vor, zwischen und nach den Drogenapplikationen nicht veränderte (s. Methodik).

Wie in den zwei hier illustrierten, so zeigte sich in weiteren vier gemessenen Dosiswirkungskurven von GABA und Glycin eine eindeutig höhere Wirksamkeit von GABA gegenüber Glycin. Zwei Punkte aus den Dosiswirkungskurven, gemessen am synaptischen Feldpotential in Abb. 6, mögen dies verdeut-

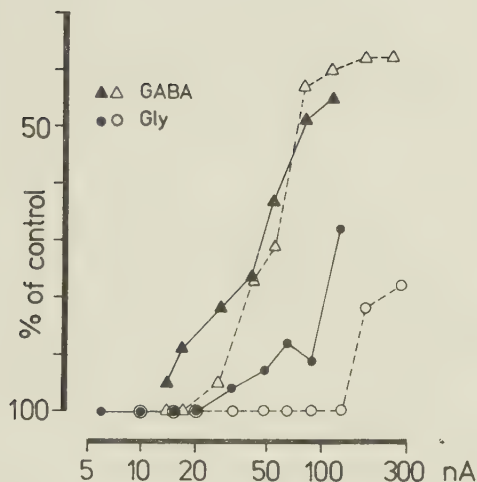


Abb. 6: Vergleich der Dosiswirkungskurven von GABA (Dreiecke) und Glycin (Kreise), gemessen am antidrom ausgelösten Feldpotential (gefüllte Symbole) und synaptischen Feldpotential (offene Symbole)

Abszisse: Iontophoreseströme in logarithmischer Auftragung (in nA).

Ordinate: Amplitude der Feldpotentiale in % der Amplitude der Kontrollfeldpotentiale ohne Einwirkung der Aminosäuren. Synaptische Feldpotentiale durch Reizung (350 μ A) des contralateralen N. interpositus hervorgerufen, antidrome Feldpotentiale durch Reizung des Rückenmarks bei C₃. Jeder Punkt der Kurve ist das Ergebnis der Mittelung von ³40 Einzelmessungen.

lichen: Während Glycin mit einem Strom von 300 nA gegeben werden mußte, um die Amplitude des Feldpotentials auf 72 % der Kontrollmessung zu reduzieren, genügten schon 30 nA GABA, also 10 % des Glycinstroms, um eine entsprechend große Hemmwirkung hervorzurufen.

Bei weiteren vergleichenden Messungen der GABA- und Glycinwirkungsstärken auf antidrome und synaptische Feldpotentiale zeigt sich, ausgehend von etwa gleichen Iontophoreseströmen, folgender Befund: Bei 95,5 % der verwendeten Elektroden war GABA im RN stärker wirksam als Glycin, nur bei 4,5 % der Elektroden übertraf Glycin GABA.

Bei den Messungen an synaptischen Feldpotentialen ergab sich ein weiterer Befund. In Abb. 7 A ist der extrazelluläre Potentialverlauf im RN nach Reizung des contralateralen NIP (300 nA) dargestellt: Auf einen Kalibrierungspuls (1 mV, 1 msec) folgt der Reizartefakt. Mit 0,4 msec Latenz auf den Artefakt tritt eine erste, spitze Negativität auf, gefolgt von einer zweiten, breitbasigen negativen Zacke mit 0,9 msec Latenz. Aus Befunden von TSUKAHARA et al. (1967) und eigenen Messungen geht hervor, daß bei intrazellulären Ableitungen in RN-Neuronen monosynaptische EPSPs mit einer mittleren Latenz von 0,9 msec nach Reizung im NIP auftreten. Die zweite Potentialauslenkung in Abb. 7 A dürfte demnach den monosynaptisch durch die NIP-Reizung induzierten EPSPs bzw. Entladungen von RN-Neuronen entsprechen (synaptisches Feldpotential). Nimmt man eine synaptische Verzögerung von 0,5 msec an (TSUKAHARA et al. 1967: $0,48 \pm 0,10$ msec für diese Verbin-

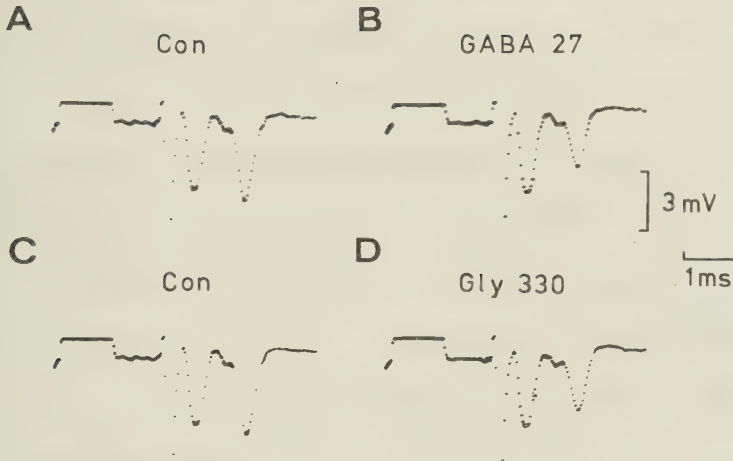


Abb. 7: Vergleich der Wirkungen von GABA (27 nA) und Glycin (330 nA) auf ein Feldpotential interpositorubraler Fasern und ein synaptisches Feldpotential im RN, hervorgerufen durch Reizung des contralateralen N. interpositus

A und C: Kontrollmessungen ohne Applikation der Aminosäuren.

B und D: Beide Potentiale unter der Einwirkung von GABA (27 nA) resp. Glycin (330 nA). Nähere Erläuterung im Text.

dung), so muß die Grundlage für das erste, spitze Potential mit einer Latenz von 0,4 msec ein präsynaptisches Ereignis sein: Die relativ synchrone Entladung in den afferenten interpositorubralen Fasern mit ihren Endaufzweigungen. Abb. 7 B und D zeigen nun, daß weder 27 nA GABA noch 330 nA Glycin dieses Feldpotential der interpositorubralen Fasern beeinflussen, obwohl die Amplitude des synaptischen Feldpotentials von GABA (27 nA) auf 62,5 % der Kontrollmessung verringert wird und von Glycin, mit einer über 10-fach höheren Strommenge (330 nA) gegeben, auf 65 %.

Da das beschriebene Feldpotential in keinem der untersuchten Fälle von GABA und Glycin beeinflusst wurde, liegt der Schluß nahe, daß die Membran der interpositorubralen Fasern gegenüber GABA und Glycin nicht empfindlich ist (vgl. CURTIS et al. 1959 und OBATA et al. 1970).

3.2. Wirkungen von GABA- und glycinähnlichen Aminosäuren

CURTIS et al. (1968 a) unterteilten neutrale hemmende Aminosäuren in Glycin- und GABA-ähnliche, je nachdem ob ihre postsynaptische Wirkung durch Strychnin gehemmt wurde oder nicht. Die Wirkungen der glycinähnlichen Aminosäure β -Alanin und der GABA-ähnlichen Aminosäuren δ -Aminovaleriansäure (AVA) und ϵ -Aminocapronsäure (ACA) auf RN-Neurone wurden an insgesamt 13 Zellen mit intrazellulären Ableitungen untersucht. Effekte wurden auf das Membranpotential, die Membranleitfähigkeit und die Amplitude synaptischer und antidromer Potentiale gemessen. AVA und β -Alanin hyperpolarisierten die Zellmembran, erhöhten

ihre Leitfähigkeit und unterdrückten synaptische und antidrome Potentiale der RN-Neurone. Damit konnten Befunde von CURTIS et al. über die postsynaptischen Wirkungen von β -Alanin an Motoneuronen des Rückenmarks (CURTIS et al. 1968 b) und von BRUGGENCATE und ENGBERG über die postsynaptischen Wirkungen von AVA an Neuronen des Deiters'schen Kerns (BRUGGENCATE und ENGBERG 1969 b und 1971) für Neurone des RN qualitativ bestätigt werden. Dagegen zeigte ACA an den untersuchten drei Zellen keine eindeutige Wirkung. Sowohl AVA wie β -Alanin waren in ihrer relativen Wirkungsstärke zwischen GABA und Glycin einzuordnen, wobei AVA β -Alanin leicht überlegen war. Entsprechende Befunde ergaben Untersuchungen an extrazellulären Feldpotentialen.

3.3. Wirkungen des Aminosäureblockers Picrotoxin

Es existieren Befunde, die dafür sprechen, daß das Krampfgift Picrotoxin relativ spezifisch die postsynaptische Wirkung von GABA zu hemmen vermag, also einen GABA-Blocker darstellt (s. Diskussion).

In 5 Versuchen wurde der Einfluß iontophoretisch applizierten Picrotoxins auf die hemmende Wirkung von GABA an RN-Neuronen untersucht. Bei der mikroiontophoretischen Verabreichung von Picrotoxin traten jedoch Schwierigkeiten auf: Die mit Picrotoxin gefüllten Iontophoresepipetten blockierten relativ häufig, d.h. ihr elektrischer Widerstand nahm so stark zu, daß genügend große Picrotoxinmengen nicht mehr freigesetzt werden konnten. Darüberhinaus verschlechterte sich der Zustand

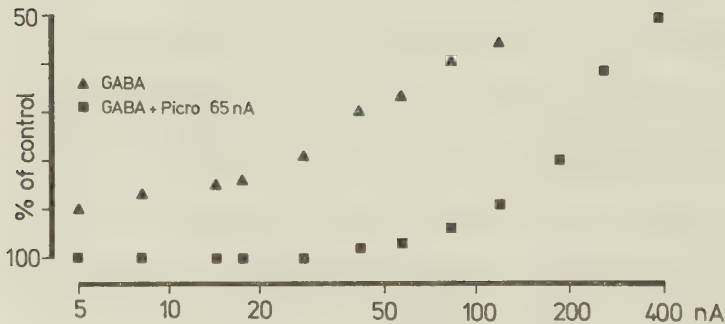


Abb. 8: Vergleich der Dosiswirkungskurven von GABA (Dreiecke) und von GABA unter gleichzeitiger Picrotoxinapplikation (65 nA, Vierecke), gemessen an einem antidrom ausgelösten Feldpotential im RN

Abszisse: Iontophoreseströme in logarithmischer Auftragung (in nA).

Ordinate: Amplitude der Feldpotentiale in % der Amplitude der Kontrollfeldpotentiale ohne Einwirkung der Substanzen. Jeder Punkt der beiden Kurven ist das Ergebnis der Mittelung von 40 Einzelmessungen.

der zwei mit intrazellulärer Ableitung untersuchten RN-Zellen mit nicht blockierenden PicROTOXINElektroden so schnell, daß nach der Untersuchung der Interaktion PicROTOXIN-GABA keine Kontrollmessungen der Effekte von GABA möglich waren. Somit kann die dabei gesehene Abnahme der GABA-induzierten Hyperpolarisation unter PicROTOXIN nicht zu einem klaren Befund verwertet werden.

Demgegenüber konnte in Messungen an extrazellulären Feldpotentialen mit 4 Elektroden eine Blockierung der durch GABA hervorgerufenen Hemmwirkung (Verkleinerung der Amplitude, s. Kap. 3.2.) durch die zusätzliche Gabe von PicROTOXIN nachgewiesen werden. Quantitative Aussagen erlaubten Messungen von Dosiswirkungskurven. Abb. 8 zeigt den Vergleich der Dosiswirkungskurven von GABA (Dreiecke) und von GABA unter gleichzeitiger PicROTOXINGabe (65 nA, Vierecke), gemessen an demselben antidromen Feldpotential. PicROTOXIN hemmt die Wirkung von GABA: Die Dosiswirkungskurve von GABA ist unter dem Einfluß PicROTOXINS deutlich nach rechts verschoben. Dies könnte ein Hinweis auf den Wirkungsmechanismus von PicROTOXIN sein (s. Diskussion). Wie stark die GABA-blockierende Wirkung von PicROTOXIN ausgeprägt war, zeigt ein Vergleich der Iontophoresestromstärken, bei welchen GABA die Amplitude des Kontrollfeldes auf 80 % reduzierte: Während dies GABA allein schon mit 25 nA herbeiführte, muß unter dem Einfluß von PicROTOXIN (65 nA) GABA mit 200 nA gegeben werden, um den gleichen Effekt zu erzielen.

4. DISKUSSION

In verschiedenen Gebieten des ZNS des Säugetieres wurde in den letzten Jahren mit Hilfe der Methode der Mikroiontophorese gezeigt, daß mehrere neutrale Aminosäuren neuronale Aktivitäten hemmen (Übersicht bei CURTIS und CRAWFORD 1969). Zwei dieser neutralen Aminosäuren, GABA und Glycin, wird aufgrund einer großen Zahl von Untersuchungen eine mögliche physiologische Funktion als hemmende Überträgerstoffe im ZNS zugeschrieben (s. Einleitung). Als Grundlage für diese Vermutung dienen dabei nicht nur Befunde über das Vorkommen dieser Aminosäuren (s. unten) und der ihren Aufbau und Abbau katalysierenden Enzymsysteme im ZNS, sondern auch ihre Wirkung an der Zellmembran: Hyperpolarisation, Leitfähigkeitszunahme und die Hemmung postsynaptischer und antidromer Potentiale, wie dies in Rückenmarksmotoneuronen (CURTIS et al. 1968 b, WERMAN et al. 1968), Interneuronen (BRUGGENCATE und ENGBERG 1968), Hypoglossusneuronen (BRUGGENCATE und SONNHOF 1972), Deitersneuronen (OBATA et al. 1967 und 1970, BRUGGENCATE und ENGBERG 1969 b und 1971) und am cerebralen Cortex gezeigt werden konnte (KRNJJEVIĆ und SCHWARTZ 1967).

Die vorliegenden Befunde über die Wirkung von Glycin und GABA an Neuronen des N. ruber stehen in Einklang mit der Überträgerstoffhypothese für diese beiden neutralen Aminosäuren: Beide hyperpolarisierten die Membran, erhöhten ihre Leitfähigkeit und hemmten antidrome und postsynaptische Potentiale.

Quantitativ zeigte GABA dabei eine eindeutig stärkere hemmende Wirkung als Glycin, gemessen an dem Vergleich der Iontophoreseströme. Aussagen quantitativer Art über die relativen Wirkungsstärken von GABA und Glycin anhand des Vergleichs der Iontophorenströme machen zu wollen, beinhaltet allerdings einige Unsicherheiten. Es ist anzunehmen, daß das Ausmaß des Effektes einer iontophoretisch applizierten Aminosäure letztlich abhängt von der Zahl ihrer an der Zellmembran einwirkenden Moleküle. Vergleiche der Wirkungsstärken der transmitterverdächtigen Substanzen müßten demnach ausgehen von gleichen Konzentrationen an der Zellmembran. Es liegt aber auf der Hand, daß, bei Anwendung der Methode der Mikroiontophorese im ZNS, die Quantität der an der Zellmembran wirkenden Moleküle nicht exakt bestimmt werden kann (s. Kap. 2.5.). Als ein indirekter Maßstab für die Konzentrationen der emittierten Substanzen an der Zelle werden üblicherweise die Iontophoreseströme herangezogen. Es besteht jedoch keine strenge Korrelation zwischen diesen beiden Größen.

Einer der Gründe dafür betrifft die Transportzahlen der iontophoretisierten Substanzen. Die Transportzahl ist definiert als das Verhältnis zwischen Menge an freigesetzter Substanz und der Strommenge, die dazu durch die Elektrode geführt werden muß ($T = \frac{n \times F}{Q}$, T=Transportzahl, n=Menge an freigesetzter Substanz (in Mol), Q=elektrische Ladung (in Coulomb), F=Faradaysche Konstante). Aus Befunden von KRNJJEVIĆ et al. (1963), ZIEGELGÄNSBERGER et al. (1969) und HOFFER et al. (1971) geht hervor, daß zwischen verschiedenen Elektroden die Trans-

portzahlen beträchtlich schwanken können, d.h. daß durch gleiche Strommengen aus verschiedenen Elektroden verschieden große Mengen an Substanz freigesetzt werden. Demnach ist es durchaus möglich, daß die Transportzahlen auch zwischen den einzelnen Rohren einer Mehrfachelektrode variieren und so einen Vergleich der Wirkungsstärken anhand der Iontophoreseströme verfälschen können.

Ein Vergleich der relativen Wirkungsstärken anhand der Iontophoreseströme könnte weiterhin verunsichert werden durch eine ungleichmäßige Verteilung der Rezeptoren für die untersuchten Substanzen über die Zellmembran. Ergebnisse am *N. hypoglossus* (ALTMANN et al. 1972) zeigen, daß Grund zu der Annahme besteht, daß hier GABA mehr im Bereich der dendritischen Membran, Glycin dagegen mehr im Bereich der Soma-Membran angreift. Daß Rezeptoren für eine der beiden untersuchten Substanzen auch an der dendritischen Membran lokalisiert sein können, zeigte DIAMOND (1968) für GABA an den Mauthnerzellen des Goldfisches. Solange die Möglichkeit nicht ausgeschlossen ist, daß die untersuchten Aminosäuren auch am RN an verschiedenen Gebieten der Zellmembran bevorzugt wirksam sind, ist bei quantitativen Vergleichen der Wirkungsstärken das Wissen um die sterische Beziehung der extrazellulären Iontophorese- wie auch der intrazellulären Ableitelektrode zu den verschiedenen Membranbezirken der untersuchten Zellen von besonderer Bedeutung. Aussagen darüber können jedoch aus den vorliegenden mikroiontophoretischen Messungen am RN nicht abgeleitet werden.

Die pK-Werte für GABA und Glycin differieren (GABA:4,2 und 10,4; Glycin: 2,35 und 9,6) und dementsprechend auch die Lage ihrer isoelektrischen Punkte (für GABA bei pH 7,3, für Glycin bei pH 6,1). Nimmt man den pH des Extrazellulär-raumes mit 7,4 an, so sollten die GABA-Moleküle zu einem Großteil als Zwitterionen vorliegen, die Glycinmoleküle dagegen zu einem kleineren Teil. Würde man voraussetzen, daß die beiden Aminosäuren als Zwitterionen ihre Wirkung auf die Zellmembran ausüben, könnte so eine stärkere Wirkung von GABA gegenüber Glycin bei gleichen absoluten Konzentrationen am Rezeptor erklärt werden. Dann müßten aber die deutlichen Befunde, die für eine Umverteilung des Verhältnisses der relativen Wirkungsstärken von GABA und Glycin entlang der Neuroaxis sprechen (s. Einleitung), aufgrund einer systematischen Veränderung des pH-Wertes des Extrazellulär-raumes entlang der Neuroaxis zustande gekommen sein. Befunde, welche die Möglichkeit einer solchen systematischen Variation des pH-Wertes im ZNS unterstützen würden, fehlen jedoch.

Auf der anderen Seite ist die beobachtete klare Differenz der Wirksamkeit von GABA und Glycin an RN-Neuronen zu groß - GABA brauchte oft nur mit einer Strommenge von 10 % des Glycinstroms gegeben werden, um gleiche Effekte hervorzurufen (s. Abb. 6) -, als daß sie durch die oben angeführten Punkte vollständig verfälscht werden könnte. Es scheint demnach gerechtfertigt, von einer höheren Empfindlichkeit der RN-Neurone gegenüber GABA als gegenüber Glycin zu sprechen.

Damit unterstützen die vorliegenden Befunde am RN der

Katze das Konzept einer systematischen Umverteilung des Verhältnisses der Wirkungsstärken von GABA und Glycin entlang der Neuroaxis, zieht man dazu die klaren Unterschiede in den Wirkungsstärken von GABA und Glycin auf den verschiedenen Niveaus des ZNS in Betracht (s. Einleitung). Die Gültigkeit einer solchen Interpretation wird unterstützt durch Ergebnisse über die regionale Verteilung von GABA und Glycin im ZNS von Säugetieren (FAHN und CÔTE 1967, GRAHAM et al. 1967, APRISON et al. 1968, SHANK und APRISON 1970, OKADA et al. 1971, PERRY et al. 1971, BOEHME et al. 1973): Die mittlere Konzentration von Glycin ist im Rückenmark am höchsten, um in caudo-rostraler Richtung entlang der Neuroaxis abzunehmen. Die mittlere Konzentration von GABA ist dagegen in höheren Regionen des ZNS, besonders in Diencephalon und Mesencephalon am größten, um über Pons und Medulla oblongata in rostro-caudaler Richtung zum Rückenmark hin abzunehmen.

Als indirektes, weiteres Indiz für die Umverteilung des Verhältnisses der Wirkungsstärken von GABA und Glycin können auch die Befunde über die hemmende Wirkung der GABA-ähnlichen Aminosäure AVA bzw. der glycinähnlichen Aminosäure β -Alanin an Neuronen des RN, im Vergleich zu Neuronen des Rückenmarks, herangezogen werden. Während an Motoneuronen (CURTIS et al. 1968 b) β -Alanin die Membran hyperpolarisierte, AVA dagegen nicht, zeigte AVA an Neuronen des RN eine deutliche Hyperpolarisation, wie sie für AVA auch an Zellen des Deiters'schen Kerns gezeigt wurde (BRUGGENCATE und ENGBERG 1969 b und 1971).

Bezogen auf den Wirkungsmechanismus der untersuchten Aminosäuren an der Membran von RN-Neuronen können die gefundene Leitfähigkeitszunahme, die Hyperpolarisation und die Reduktion von synaptischen und antidromen Potentialen in einen kausalen Zusammenhang gebracht werden:

Der ionale Mechanismus, welcher der physiologischen postsynaptischen Hemmung von Neuronen, also dem IPSP, zugrunde liegt, scheint aus einer Zunahme der Leitfähigkeit der subsynaptischen Membran hauptsächlich für Chloridionen (LUX 1971, LUX et al. 1971, LLINÁS und BAKER 1972) zu bestehen. Daneben sind in geringerem Ausmaß möglicherweise Kaliumionen (COOMBS, ECCLES und FATT 1955 b, ECCLES 1966) beteiligt. Demnach würde sich das IPSP, also die vorübergehende Hyperpolarisation der Membran, vor allem richten nach dem Gleichgewichtspotential für Chloridionen, das bestimmt wird durch den elektrochemischen Gradienten für Chloridionen zwischen dem Außen- und Innenmilieu der Zelle. Dieser würde durch einen postulierten aktiven Pumpmechanismus für Chloridionen vom Zellinneren nach dem Zelläußeren auf einem höheren Niveau gehalten, als es die Verteilung von Chloridionen dies- und jenseits der Zellmembran erwarten ließe (LUX 1971, LLINÁS und BAKER 1972). An Motoneuronen des Rückenmarks (CURTIS et al. 1968 b, WERMAN et al. 1968) und an Neuronen des cerebralen Cortex (KRNJEVIĆ und SCHWARTZ 1967, KELLY et al. 1968, DREIFUSS et al. 1969) konnte nachgewiesen werden, daß die Ionenmechanismen, die zu einer Hyperpolarisation der Membran führen, für den physiologischen Transmitter des IPSP und die

getesteten Aminosäuren Glycin bzw. GABA identisch sind: Beide Hyperpolarisationen besaßen dieselben Umkehrpotentiale bei intrazellulärer Stromzugabe und beide Hyperpolarisationen waren durch die Injektion von Chlorid- und anderen Anionen in das Zellinnere gleichsinnig und im selben Ausmaße zu beeinflussen.

Daraus würde für den Wirkungsmechanismus von GABA und Glycin an RN-Neuronen folgen, daß die nachgewiesene Hyperpolarisation der Zellmembran bedingt ist durch ihre gleichzeitige Leitfähigkeitszunahme (s. Abb. 5), u.U. für Chloridionen. Die in Abb. 3 A, 4 A' und B' illustrierte Verminderung der Amplitude rubraler EPSPs durch GABA und Glycin bei gleichzeitiger Hyperpolarisation der Zellmembran (s. Abb. 3 B), also bei einer Entfernung des Membranpotentials vom Gleichgewichtspotential des EPSP (ECCLES 1966), sollte ebenfalls durch die Leitfähigkeitszunahme der Membran und den dadurch bedingten Kurzschlußeffekt für die Ionenströme des EPSP zustandekommen (vgl. OBATA et al. 1967, CURTIS et al. 1959). Eine Erhöhung der Leitfähigkeit, zusammen mit einer Hyperpolarisation der Membran dürfte im selben Sinne auch der Blockade von antidromen Aktionspotentialen in RN-Zellen durch GABA und Glycin zugrunde liegen (s. Abb. 4 A und B): Durch eine Leitfähigkeitserhöhung und Hyperpolarisation ist die Blockierung der Überleitung von IS- zum SD-Spike und die Verminderung der Amplitude des IS-Spikes zu erklären (vgl. OBATA et al. 1967).

Der Zeitgang der durch GABA und Glycin an RN-Neuronen

bewirkten Hyperpolarisation zeigte, besonders bei längerer Applikationsdauer, häufig folgendes Verhalten: Nach dem Erreichen eines Maximums verringerte sich das Ausmaß der Hyperpolarisation kontinuierlich, obwohl die Substanzen aus nicht blockierenden Elektroden mit konstanten Strömen an die Zellen gebracht wurden (vgl. Abb. 5 A). Dieses Merkmal war bei GABA-induzierten Hyperpolarisationen häufiger festzustellen als bei Glycin-induzierten. Dasselbe Verhalten der Membranhyperpolarisation durch GABA und Glycin wurde von verschiedenen Autoren auch am Motoneuron des Rückenmarks (CURTIS et al. 1968 b) und an Neuronen des Cortex cerebri (KRNJEVIĆ und SCHWARTZ 1967, KELLY und KRNJEVIĆ 1968, DREIFUSS et al. 1969) beobachtet und diskutiert. Ob ihm eine "Desensitisierung" von Rezeptoren gegenüber den Aminosäuren, ähnlich der Desensitisierung des Muskels gegenüber Acetylcholin (KATZ und THESLEFF 1957), oder der Desensitisierung des Schließmuskels des Krebses gegenüber GABA (HATT und DUDEL 1973) zugrunde liegt, ist unklar (CURTIS et al. 1968 b, DREIFUSS et al. 1969). Daneben können noch weitere mögliche Faktoren diskutiert werden, wie eine Inaktivierung von Chloridionen (DREIFUSS et al. 1969), entsprechend der Natrium-Inaktivierung am peripheren Neuron (HODGKIN und HUXLEY 1952); eine depolarisierende Wirkung von relativ hohen Dosen der Aminosäuren, bedingt durch eine Erhöhung der Leitfähigkeit für Natriumionen (KRNJEVIĆ und SCHWARTZ 1967, CURTIS et al. 1968 b); eine lokale pH-Änderung (CURTIS et al. 1968 b); oder ein beträchtlicher Einwärtsstrom von Chloridionen

(KRNJEVIĆ und SCHWARTZ 1967, DREIFUSS et al. 1969). In Betracht zu ziehen wäre ebenfalls die Möglichkeit einer Aktivierung von vorher inaktiven Chlorid-Kompartimenten des Zellinneren durch eine relativ langandauernde Aminosäureeinwirkung.

Zwar erscheint es möglich, aus den hier vorgelegten Befunden eine höhere Wahrscheinlichkeit für die Existenz von GABA als hemmenden Transmitter an Neuronen des RN als für Glycin herauszulesen, doch fehlen noch eine Reihe von notwendigen Nachweisen, um diese Möglichkeit zu verifizieren:

Von verschiedenen Autoren sind Kriterien festgelegt worden, welche erfüllt werden müßten, um eine Substanz als physiologischen Transmitter zu identifizieren (McLENNAN 1963, WERMAN 1966, BLOOM und GIARMAN 1968). Diese können in folgenden vier Punkten zusammengefaßt werden: 1. Existenz des vermuteten Transmitters und seiner auf- und abbauenden Enzymsysteme in den Terminalen afferenter Fasern. 2. Sammelbarkeit des vermuteten Transmitters nach orthodromer Reizung und Freisetzung aus den Nervenendigungen. 3. Physiologische Identität (Identität der Wirkungen). 4. Pharmakologische Identität.

Während die beiden ersten Punkte mit biochemischen und histochemischen Methoden angegangen werden müssen, können die beiden letzten Kriterien mit Hilfe der Methode der Mikroiontophorese geklärt werden. Je zahlreicher diese Kriterien für eine transmitterverdächtige Substanz nachgewiesen werden können, desto wahrscheinlicher ist deren Identität mit dem physiologischen Transmitter. Bezogen auf die fragliche Rolle von

GABA als hemmenden Transmitter an Neuronen des roten Kerns läßt sich zu den oben angeführten Kriterien folgendes feststellen:

zu 1.: GABA konnte im Gebiet des RN nachgewiesen werden. So enthält der RN des Menschen $1,86 \mu\text{Mol/g}$ GABA (PERRY et al. 1971). Auch in Präparationen von isolierten RN-Zellkörpern, zusammen mit den an ihnen haftenden synaptischen Endknöpfen, konnte GABA nachgewiesen werden (MIYATA et al. 1970). Derartige Präparate enthielten mit $3,5 \text{ mMol}$ deutlich mehr GABA als Motoneurone ($0,9 \text{ mMol}$, OTSUKA et al. 1971) des Rückenmarks.

zu 2.: Die Erfüllung dieses Kriteriums erscheint durch die anatomische Lage des RN schwer möglich.

zu 3.: Obwohl die nachgewiesene Hyperpolarisation und Leitfähigkeitszunahme von RN-Neuronen typische Eigenschaften der physiologischen postsynaptischen Hemmung sind, können diese Effekte allein nicht genügen, um die Rolle von GABA als möglichen physiologischen Transmitter am RN abzuklären. Es sollte noch der Nachweis erbracht werden, daß die Membranhyperpolarisierung durch die als Transmitter verdächtige Substanz demselben Ionenmechanismus folgt, wie die physiologische postsynaptische Hemmung, das IPSP. Demnach sollten beide Hyperpolarisationen dasselbe Umkehrpotential (Gleichgewichtspotential) besitzen (WERMANN 1966, CURTIS et al. 1968 b).

Auch an RN-Neuronen kann gezeigt werden, daß die durch GABA induzierte Hyperpolarisation in eine Depolarisation

umkehrbar ist, wenn hyperpolarisierende Ströme durch Zitrat-elektroden in das Zellinnere geführt werden, d.h. der Zelle eine Hyperpolarisation aufgezwungen wird: In Abb. 9 C ist die Reaktion der durch GABA (34 nA) hervorgerufenen Hyperpolarisation einer RN-Zelle auf hyper- und depolarisierende Ströme illustriert. 12 nA hyperpolarisierenden Stroms drehen den Effekt von GABA auf das Membranpotential um: GABA depolarisiert die Zelle um 2,2 mV. Im Gegensatz dazu vergrößert sich die Amplitude der Hyperpolarisation durch GABA, wenn das Ruhemembranpotential der Zelle gegen 0 verschoben, also depolarisiert wird: 20 nA bzw. 30 nA depolarisierenden Stroms vergrößern die Amplitude der Hyperpolarisation zunehmend auf 3,7 bzw. 5,5 mV.

In Abb. 9 A ist die Potentialfolge illustriert, die sich nach Reizung des Rückenmarks in derselben RN-Zelle ableiten ließ: Eine frühe Depolarisation ist gefolgt von einer relativen Hyperpolarisation des Membranpotentials (markiert durch Punkte), die wiederum übergeht in eine späte, langanhaltende Depolarisation. Die Stromanalyse zeigt, daß es sich bei dieser relativen Hyperpolarisation aber um keine IPSPs, sondern um eine Disfacilitierung, also eine Verringerung eines tonischen Erregungszuflusses handelt: Depolarisierende Ströme (20 und 30 nA) verringern die Amplitude dieser relativen Hyperpolarisation. IPSPs würden dagegen auf die Depolarisation des Membranpotentials mit einer Erhöhung der Amplitude reagieren.

In den dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuchen, konn-

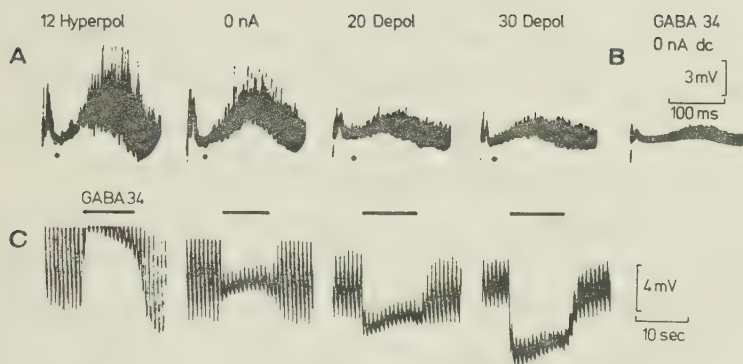


Abb. 9: Einfluß der Veränderung des Membranpotentials eines RN-Neurons auf eine Folge synaptischer Potentiale und auf die, durch GABA hervorgerufene, Hyperpolarisation der Membran

A: Einfluß der Veränderung des Membranpotentials durch Injektion von hyperpolarisierenden (12 nA) und depolarisierenden (20 und 30 nA) Gleichströmen durch die Ableitelektrode auf eine Potentialfolge (ausgelöst durch Rückenmarkreizung bei C_3). Punkte markieren eine Disfacilitation des RN-Neurons. (Nähere Erläuterung im Text, vgl. Abb. 1). Mehrere Oscilloscoppdurchläufe übereinanderprojiziert, Wechselstromregistrierung.

B: Wirkung von GABA (34 nA) auf diese Potentialfolge. Die Amplitude aller daran beteiligten Membranpotentialauslenkungen wird drastisch reduziert.

C: Einfluß der Veränderung des Membranpotentials durch Injektion von Gleichströmen auf die GABA-induzierte Hyperpolarisation (Gleichstromregistrierung). Ausschnitte aus der fortlaufenden Messung des Membranpotentials. GABA-Applikationen durch Balken markiert (34 nA). Nähere Erläuterung im Text.

ten bisher in Neuronen des RN keine disynaptischen IPSPs ausgelöst werden, wie sie nach Reizung in der Pyramide nachgewiesen wurden (TSUKAHARA et al. 1967 und 1969). Deren Umkehrpotential hätte dann mit dem der Hyperpolarisation durch GABA verglichen werden können. Somit fehlt noch der Nachweis einer möglichen Identität der Wirkung von GABA mit der des Transmitters postsynaptischer Hemmung im RN.

zu 4.: Die Wirkungen einer als Transmitter in Frage kommenden Substanz sollten auf dieselbe Art und Weise pharmakologisch zu beeinflussen sein wie der entsprechende physiologische Hemmungsmechanismus, das IPSP. Könnte z.B. nachgewiesen werden, daß ein spezifischer Blocker sowohl die Wirkung von GABA am RN, als auch rubrale IPSPs unterdrückt, so wäre dies ein gewichtiges Glied in der Kette der Hinweise auf eine mögliche funktionelle Rolle von GABA als den Transmitter physiologischer Hemmung im RN.

Von Picrotoxin, einem krampferzeugenden Alkaloid (RAMWELL und SHAW 1963), ist schon länger bekannt, daß es in Invertebraten als GABA-Antagonist wirkt und postsynaptische IPSPs unterdrückt (ROBINS und KLOOT 1958, GRUNDFEST et al. 1959, USHERWOOD und GRUNDFEST 1965, TAKEUCHI und TAKEUCHI 1969). In letzter Zeit wurde die blockierende Wirkung von Picrotoxin auf GABA-Effekte auch in Säugetieren gezeigt (BRUGGENCATE und ENGBERG 1969 a, GALINDO 1969, ENGBERG und THALLER 1970, OBATA et al. 1970, BRUGGENCATE und SONNHOF 1972), wie auch die Unterdrückung von IPSPs (KELLERTH und SZUMSKI 1966, OBATA et al. 1967, ITO et al. 1970 a und 1970 b, PRECHT und

YOSHIDA 1971, MORIMOTO und KAWAMURA 1972). Gegen die Rolle Picrotoxins als GABA-Antagonist sind zwar Einwände erhoben worden (s. CURTIS et al. 1971 a), doch zeigen die Ergebnisse am *N. hypoglossus* (BRUGGENCATE und SONNHOF 1972), daß Picrotoxin auch im ZNS des Säugers als GABA-Blocker anzusehen ist, dessen Spezifität gegenüber GABA jedoch weniger stark ausgeprägt ist als z.B. diejenige Strychnins gegenüber Glycin.

Aus diesem Grunde wurde in einigen der Versuche die Wirkung iontophoretisch ejizierten Picrotoxins auf die Effekte von GABA an Neuronen des RN untersucht. Auch im RN blockierte Picrotoxin die Wirkungen von GABA. Dies zeigt sich deutlich in der Rechtsverschiebung der Dosiswirkungskurve von GABA unter dem Einfluß von Picrotoxin in Abb. 8 (Entsprechende Befunde bei OBATA et al. 1970 und BRUGGENCATE und ENGBERG 1971). Die Rechtsverschiebung der Dosiswirkungskurve könnte für einen kompetitiven Antagonismus (ARIENS und SIMONIS 1964) Picrotoxin-GABA sprechen. Die Interpretation von iontophoretisch erbrachten Dosiswirkungskurven stößt jedoch auf prinzipielle Schwierigkeiten (s. Appendix in CURTIS et al. 1971 c). Aussagen über die Kinetik des Antagonismus zwischen Picrotoxin und GABA sind deshalb nicht möglich. So könnte die Rechtsverschiebung auch ohne Vorliegen eines kompetitiven Antagonismus zustande gekommen sein, daß Picrotoxin, mit relativ geringem Strom gegeben, nur Membranbezirke der Zelle nahe der Iontophoreselektrode erreichte, GABA dagegen mit zunehmend höheren Strömen auch in zuneh-

mendem Maße auf entfernter liegende Membrananteile einwirkte, die von den Picrotoxinmolekülen gar nicht erreicht wurden, und so dort GABA mit Picrotoxin nicht interferierte (vgl. CURTIS et al. 1969 über den Strychnin-Glycin Antagonismus).

Da, wie oben erwähnt, im RN bisher keine disynaptischen IPSPs ausgelöst werden konnten, fehlte die Möglichkeit, die gefundene Blockierung der postsynaptischen GABA-Effekte durch Picrotoxin vergleichen zu können mit dem Einfluß von Picrotoxin auf die physiologische postsynaptische Hemmung im RN. Somit steht auch der Nachweis einer möglichen pharmakologischen Identität von GABA und dem Transmitter der postsynaptischen Hemmung am RN noch aus.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Wirkungen neutraler Aminosäuren, insbesondere von γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glycin, wurden mikroiontophoretisch im N. ruber der Katze untersucht. In intrazellulären Messungen wurde ihr Einfluß auf die elektrischen Eigenschaften der Membran rubrospinaler Neurone (Membranpotential, Membranleitfähigkeit) und auf antidrome und postsynaptische Potentiale studiert, in extrazellulären Messungen ihre Wirkung auf antidrome und synaptische Feldpotentiale.

2. Sowohl GABA wie Glycin besaßen, die Neurone hemmende, transmitterähnliche Wirkungen: Sie hyperpolarisierten die Membran, erhöhten ihre Leitfähigkeit und verminderten die Amplitude antidromer und postsynaptischer Potentiale, sowie von extrazellulär abgeleiteten Feldpotentialen. Quantitativ war GABA wesentlich stärker wirksam als Glycin, gemessen am Vergleich der Iontophoreseströme.

3. Mit der Methode der Mikroiontophorese wurden daneben die Wirkungen von GABA- und glycinähnlichen neutralen Aminosäuren an Neuronen des roten Kerns analysiert. δ -Aminovaleriansäure und β -Alanin hatten qualitativ dieselben hemmenden Effekte wie GABA und Glycin in intra- wie extrazellulären Messungen. In ihrer relativen Wirkungsstärke waren sie zwischen GABA und Glycin einzuordnen, wobei δ -Aminovaleriansäure β -Alanin leicht übertraf.

4. Mikroiontophoretisch appliziertes Picrotoxin blockierte in extrazellulären Messungen an Feldpotentialen durch GABA hervorgerufene Hemmungsphänomene an Neuronen des N. ruber.

5. Die Befunde werden eingehend diskutiert. Sie deuten darauf hin, daß GABA an rubrospinalen Neuronen eine Rolle als hemmender Überträgerstoff spielen könnte.

6. LITERATUR

- Altmann, H., G. ten Bruggencate und U. Sonnhof:
Differential strength of action of glycine and GABA in hypoglossus nucleus.
Pflügers Arch. 331, 90-94 (1972)
- Aprison, M.H., R.P. Shank und R.A. Davidoff:
A comparison of the concentration of glycine, a transmitter suspect, in different areas of the brain and spinal cord in seven different vertebrates.
Comp. Biochem. Physiol. 28, 1345-1355 (1969)
- Ariens, E.J. und A.M. Simonis:
Drug receptor interactions: interaction of one or more drugs with one receptor system. In: Molecular Pharmacology, Bd. 1, hsg. von E.J. Ariens.
Academic Press, New York, 287-393 (1964)
- Bloom, F.E. und N.J. Giarman:
Current status of neurotransmitters. In: Ann. reports in medical chemistry 1967, hsg. von C.K. Cain.
Academic Press, London, 264-278 (1968)
- Boehme, D.M., H.W. Fordice, N. Marks und W. Vogel:
Distribution of glycine in human spinal cord and selected regions of brain.
Brain Res. 50, 353-359 (1973)
- Bruggencate, G. ten und I. Engberg:
Analysis of glycine actions on spinal interneurons by intracellular recording.
Brain Res. 11, 446-450 (1968)
- Bruggencate, G. ten und I. Engberg:
Is picrotoxin a blocker of the postsynaptic inhibition induced by GABA (γ -aminobutyric acid)?
Pflügers Arch. 312, 121 (1969 a)
- Bruggencate, G. ten und I. Engberg:
Effects of GABA and related amino acids on neurones in Deiters' nucleus.
Brain Res. 14, 533-536 (1969 b)
- Bruggencate, G. ten und I. Engberg:
Ionophoretic studies in Deiters' nucleus of the inhibitory actions of GABA and related amino acids and the interactions of strychnine and picrotoxin.
Brain Res. 25, 431-448 (1971)

Bruggencate, G. ten und U. Sonnhof:
Effects of glycine and GABA, and blocking actions of strychnine and picrotoxin in the hypoglossus nucleus.
Pflügers Arch. 334, 240-252 (1972)

Cannon, W.B. und Z.H. Baq:
Studies on the conditions of activity in endocrine organs, XXVI. A hormone produced by symathetic action on smooth muscle.
Am. J. Physiol. 96, 392-412 (1931)

Coombs, J.S., J.C. Eccles und P. Fatt:
The electrical properties of the motoneurone membrane.
J. Physiol. (Lond.) 130, 291-325 (1955 a)

Coombs, J.S., J.C. Eccles und P. Fatt:
The specific ionic conductance and the ionic movements across the motoneuronal membrane that produce the inhibitory post-synaptic potential.
J. Physiol. (Lond.) 130, 326-373 (1955 b)

Coombs, J.S., J.C. Eccles und P. Fatt:
Excitatory synaptic action in motoneurons.
J. Physiol. 130, 374-395 (1955 c)

Curtis, D.R.:
Microelectrophoresis. In: Physical techniques in biological research, Bd. 5, hsg. von W.L. Nastuk.
Academic Press, New York, 144-190 (1964)

Curtis, D.R.:
The pharmacology of spinal postsynaptic inhibition.
Progress in Brain Res. 31, 171-189 (1969)

Curtis, D.R. und J.M. Crawford:
Central synaptic transmission - microelectrophoretic studies.
Ann. Rev. Pharmacol. 9, 209-240 (1969)

Curtis, D.R., A.W. Duggan, D. Felix und G.A.R. Johnston:
Bicuculline, an antagonist of GABA and synaptic inhibition in the spinal cord of the cat.
Brain Res. 32, 69-96 (1971 a)

Curtis, D.R., A.W. Duggan, D. Felix, G.A.R. Johnston und H. McLennan:
Antagonism between bicuculline and GABA in the cat brain.
Brain Res. 33, 57-73 (1971 b)

Curtis, D.R., A.W. Duggan und G.A.R. Johnston:
Glycine, strychnine, picrotoxin and spinal inhibition.
Brain Res. 14, 759-762 (1969)

Curtis, D.R., A.W. Duggan und G.A.R. Johnston:

The specificity of strychnine as a glycine antagonist in the mammalian spinal cord.

Exp. Brain Res. 12, 547-565 (1971 c)

Curtis, D.R., L. Hösli und G.A.R. Johnston:

A pharmacological study of the depression of spinal neurones by glycine and related amino acids.

Exp. Brain Res. 6, 1-18 (1968 a)

Curtis, D.R., L. Hösli, G.A.R. Johnston und I.H. Johnston:

The hyperpolarization of spinal motoneurones by glycine and related amino acids.

Exp. Brain Res. 5, 235-258 (1968 b)

Curtis, D.R., J.W. Phillis und J.C. Watkins:

The depression of spinal neurones by γ -amino-n-butyric acid and β -alanine.

J. Physiol. (Lond.) 146, 185-203 (1959)

Dale, H.M., W. Feldberg und M. Vogt:

Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings.

J. Physiol. (Lond.) 86, 353-380 (1936)

Davis, R. und R.D. Huffman:

Pharmacology of the brachium conjunctivum-red nucleus synaptic system in the baboon.

Fed. Proc. 28, 775 (1969)

Diamond, J.:

The activation and distribution of GABA and L-glutamate receptors on goldfish Mauthner neurones: an analysis of dendritic remote inhibition.

J. Physiol. (Lond.) 194, 669-723 (1968)

Dreifuss, J.J., J.S. Kelly und K. Krnjević:

Cortical inhibition and γ -aminobutyric acid.

Exp. Brain Res. 9, 137-154 (1969)

Eccles, J.C.:

A review and restatement of the electrical hypotheses of synaptic excitatory and inhibitory action.

Arch. Sci. physiol. 3, 567-584 (1949)

Eccles, J.C.:

The physiology of synapses.

Springer Verlag, Berlin (1964)

Eccles, J.C.:

The ionic mechanism of excitatory and inhibitory synaptic action.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 137, 473-494 (1966)

- Eide, E.:
Input amplifier for intracellular potential and conductance measurements.
Acta physiol. scand. 73, 1A-2A (1968)
- Engberg, I. und A. Thaller:
On the interaction of picrotoxin with GABA and glycine in the spinal cord.
Brain Res. 19, 151-154 (1970)
- Fahn, S. und L.J. Côté:
Regional distribution of γ -aminobutyric acid (GABA) in brain of the rhesus monkey.
J. Neurochem. 15, 209-213 (1968)
- Feldberg, W.:
Present views on the mode of action of acetylcholine in the central nervous system.
Physiol. Rev. 25, 596-642 (1945)
- Feldberg, W. und J.H. Gaddum:
The chemical transmitter at synapses in a sympathetic ganglion.
J. Physiol. (Lond.) 81, 305-319 (1934)
- Felix, D. und H. McLennan:
The effect of bicuculline on the inhibition of mitral cells of the olfactory bulb.
Brain Res. 25, 661-664 (1971)
- Forel, A.:
Einige hirnanatomische Betrachtungen und Ergebnisse.
Arch. Psychiat. Nervenkr. 18, 162-198 (1887)
- Galindo, A.:
GABA-Picrotoxin interaction in the mammalian central nervous system.
Brain Res. 14, 763-767 (1969)
- Galindo, A., K. Krnjević und S. Schwartz:
Micro-iontophoretic studies on neurones in the cuneate nucleus.
J. Physiol. (Lond.) 192, 359-377 (1967)
- Gerlach, J.:
Von dem Rückenmarke. In: Handbuch der Lehre von den Geweben, Bd. 2, hsg. von Stricker, (1871)
- Graham jr., L.T., R.P. Shank, R. Werman und M.H. Aprison:
Distribution of some synaptic transmitter suspects in cat spinal cord: Glutamic acid, aspartic acid, γ -aminobutyric acid, glycine and glutamine.
J. Neurochem. 14, 465-472 (1967)

- Grundfest, H., J.P. Reuben und W.H. Rickles jr.:
The electrophysiology and pharmacology of lobster neuromuscular synapses.
J. gen. Physiol. 42, 1301-1329 (1959)
- Hatt, H. und J. Dudel:
Desensitization to the action of γ -aminobutyric acid (GABA) in crayfish: Different effects in the two muscles of the propodite.
Pflügers Arch. 343 Suppl. Abstract 135 (1973)
- His, W.:
Zur Geschichte des menschlichen Rückenmarks und der Nervenwurzeln.
Leipzig (1886)
- Hösli, L. und A.K. Tebećis:
Action of amino acids and convulsants on bulbar reticular neurones.
Exp. Brain Res. 11, 111-127 (1970)
- Hösli, L., A.K. Tebećis und N. Filias:
Effects of glycine, beta-alanine and GABA and their interaction with strychnine on brain stem neurones.
Brain Res. 16, 293-295 (1969)
- Hodgkin, A.L. und A.F. Huxley:
A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.
J. Physiol. (Lond.) 117, 500-544 (1952)
- Hoffer, B.J., N.H. Neff und G.R. Siggins:
Microiontophoretic release of norepinephrine from micropipettes.
Neuropharmacol. 10, 175-180 (1971)
- Ito, M., S.M. Highstein und J. Fukuda:
Cerebellar inhibition of the vestibulo-ocular reflex in rabbit and cat and its blockage by picrotoxin.
Brain Res. 17, 524-526 (1970 a)
- Ito, M., S.M. Highstein und T. Tsuchiya:
The postsynaptic inhibition of rabbit oculomotor neurones by secondary vestibular impulses and its blockage by picrotoxin.
Brain Res. 17, 520-523 (1970 b)
- Johnson, E.S., M.H.T. Roberts und D.W. Straughan:
Amino acid induced depression of cortical neurones.
Brit J. Pharmacol. 38, 659-666 (1970)
- Katz, B. und S. Thesleff:
A study of the "desensitization" produced by acetylcholine at the motor end-plate.
J. Physiol. (Lond.) 138, 63-80 (1957)

Kawamura, H. und L. Provini:

Depression of cerebellar Purkinje cells by microiontophoretic application of GABA and related amino acids.
Brain Res. 24, 293-304 (1970)

Kellerth, J.O. und A.J. Szumski:

Two types of stretch-activated postsynaptic inhibitions in spinal motoneurons as differentiated by strychnine.
Acta physiol. scand. 63, 133-145 (1966)

Kelly, J.S. und K. Krnjević:

Effects of γ -aminobutyric acid and glycine on cortical neurones.
Nature 219, 1380-1381 (1968)

Kelly, J.S., K. Krnjević, M.E. Morris und G.K.W. Yim:

Anionic permeability of cortical neurones.
Exp. Brain Res. 7, 11-31 (1969)

Krnjević, K.:

Glutamate and GABA in brain.
Nature (Lond.) 228, 119-224 (1970)

Krnjević, K., R. Lavery und D.F. Sharman:

Ionophoretic release of adrenaline, noradrenaline and 5-hydroxy-tryptamine from micropipettes.
Brit. J. Pharmacol. 20, 491-496 (1963)

Krnjević, K., M. Randić und D.W. Straughan:

Pharmacology of cortical inhibition.
J. Physiol. (Lond.) 184, 78-105 (1966)

Krnjević, K. und J.W. Phillis:

Ionophoretic studies of neurones in the mammalian cerebral cortex.
J. Physiol. (Lond.) 165, 274-304 (1963)

Krnjević, K. und S. Schwartz:

The action of γ -aminobutyric acid on cortical neurones.
Exp. Brain Res. 3, 320-336 (1967)

Krnjević, K. und S. Schwartz:

The inhibitory transmitter in the cerebral cortex.
In: Structure and functions of inhibitory neuronal mechanisms, Pergamon Press, Oxford, 419-427 (1968)

Llinás, R. und R. Baker:

A chloride-dependent inhibitory postsynaptic potential in cat tracheal motoneurons.
J. Neurophysiol. 35, 484-493 (1972)

Loewi, O.:

Über die humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung.
Pflüg. Arch. 189, 239-242 (1921)

Lux, H.D.:

Ammonium and chloride extrusion: hyperpolarizing synaptic inhibition in spinal motoneurons.
Science 173, 555-557 (1971)

Lux, H.D., C. Loracher und E. Neher:

Action of ammonium on postsynaptic inhibition of cat spinal motoneurons.

Exp. Brain Res. 11, 431-447 (1971)

Massion, J.:

The mammalian red nucleus.

Physiol. Rev. 47, 383-436 (1967)

McLennan, H.:

Synaptic transmission.

Saunders, Philadelphia (1963)

Miyata, Y., K. Obata, Y. Tanaka und M. Otsuka:

Determination of γ -aminobutyric acid in isolated nerve cells of the brain stem of the cat.

J. Physiol. Soc. Japan 32, 377-378 (1970)

Morimoto, T. und Y. Kawamura:

Inhibitory postsynaptic potentials of hypoglossal motoneurons of the cat.

Exp. Neurology 37, 188-198 (1972)

Nelson, P.G. und K. Frank:

Extracellular potential fields of single spinal motoneurons.

J. Neurophysiol. 27, 913-927 (1964)

Obata, K. und J.M. Highstein:

Blocking by picrotoxin of both vestibular inhibition and GABA action on rabbit oculomotor neurones.

Brain Res. 18, 538-541 (1970)

Obata, K., M. Ito, R. Ochi und N. Sato:

Pharmacological properties of the postsynaptic inhibition by Purkinje cell axons and the action of γ -aminobutyric acid on Deiters neurones.

Exp. Brain Res. 4, 43-57 (1967)

Obata, K., K. Takeda und H. Shinozaki:

Further study on pharmacological properties of the cerebellar-induced inhibition of Deiters neurones.

Exp. Brain Res. 11, 327-342 (1970)

Okada, Y., C. Nitsch-Hassler, J.S. Kim, I.J. Bak und R. Hassler:

Role of γ -aminobutyric acid (GABA) in the extrapyramidal motor system. 1. Regional distribution of GABA in rabbit, rat, guinea pig and baboon CNS.

Exp. Brain Res. 13, 514-518 (1971)

- Otsuka, M., K. Obata, Y. Miyata und Y. Tanaka:
Measurement of γ -aminobutyric acid in isolated nerve cells
of cat central nervous system.
J. Neurochem. 18, 287-295 (1971)
- Perry, T.L., K. Berry, S. Hansen, S. Diamond und C. Mok:
Regional distribution of amino acids in human brain obtained
at autopsy.
J. Neurochem. 18, 513-519 (1971)
- Precht, W. und M. Yoshida:
Blockage of caudate evoked inhibition of neurones in the
substantia nigra by picrotoxin.
Brain Res. 32, 229-233 (1971)
- Ramwell, D.W. und J.E. Shaw:
Some observations on the physical and pharmacological proper-
ties of picrotoxin solutions.
J. Pharm. Pharmacol. 15, 611-619 (1963)
- Robbins, J. und W.G. von der Kloot:
The effect of picrotoxin on peripheral inhibition in the
crayfish.
J. Physiol. (Lond.) 143, 541-552 (1958)
- Shank, R.P. und M.H. Aprison:
The metabolism in vivo of glycine and serine in eight areas
of the rat central nervous system.
J. Neurochem. 17, 1461-1475 (1970)
- Sherrington, C.S.:
The central nervous system.
In: A Text-Book of Physiology, 7. Aufl., hsg. von M. Foster
Macmillan, London, (1897)
- Sonnhof, U.:
A multibarrelled coaxial electrode for iontophoresis and
intracellular recording with a gold shield of the central
pipette for capacitance neutralisation.
Pflügers Arch. 341-358 (1973)
- Takeuchi, A. und N. Takeuchi:
A study of the action of picrotoxin on the inhibitory neuro-
muscular junction of the crayfish.
J. Physiol. (Lond.) 205, 377-391 (1969)
- Tebēcis, A.K. und A. Di Maria:
Strychnine-sensitive inhibition in the medullary reticular
formation: evidence for glycine as an inhibitory transmitter.
Brain Res. 40, 373-383 (1972)

Toyama, K., N. Tsukahara und M. Udo:
Nature of the cerebellar influences upon the red nucleus
neurons.
Exp. Brain Res. 4, 292-309 (1967)

Tsukahara, N. und K. Kosaka:
The mode of cerebral excitation of red nucleus neurones.
Exp. Brain Res. 5, 102-117 (1968)

Tsukahara, N., D.R.G. Fuller und V.B. Brooks:
Inhibitory potentials in red nucleus neurons.
Proc. Can. Fed. Biol. soc. 10, 142 (1967)

Tsukahara, N., D.R.G. Fuller und V.B. Brooks:
Collateral pyramidal influences on the corticorubrospinal
system.
J. Neurophysiol. 31, 467-484 (1968)

Tsukahara, N., K. Toyama und K. Kosaka:
Electrical activity of red nucleus neurones investigated
with intracellular microelectrodes. .
Exp. Brain Res. 4, 18-33 (1967)

Usherwood, P.N.R. und G. Grundfest:
Peripheral inhibition in skeletal muscle of insects.
J. Neurophysiol. 28, 497-518 (1965)

Waldeyer, H.W.G.:
Über einige neuere Forschungen im Gebiete der Anatomie des
Zentralnervensystems.
Dtsch. med. Wschr. 17, 1213-1218 (1891)

Werman, R.:
Criteria for identification of a central nervous system
transmitter.
Comp. Biochem. Physiol. 18, 745-766 (1966)

Werman, R., R.A. Davidoff und M.H. Aprison:
Inhibitory action of glycine on spinal neurons in the cat.
J. Neurophysiol. 31, 81-95 (1968)

Zieglgänsberger, W., A. Herz und H. Teschemacher:
Electrophoretic release of tritium-labelled glutamic acid
from micropipettes in vitro.
Brain Res. 15, 298-300 (1969)

Herrn Prof. Dr. K. Kramer danke ich für die Arbeitsmöglichkeit, die er mir an seinem Institut einräumte.

Herrn Prof. Dr. G. ten Bruggencate gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und seine wertvolle Unterstützung durch Anleitung und Diskussion.

Frl. U. Catoir und Herrn K.-H. Brehm danke ich für ihre stets hilfsbereite Assistenz und Frl. L. Schindler für die Niederschrift dieser Arbeit.

Lebenslauf

Geboren: 23.3.1944 in Reichenberg/Böhmen

Eltern: Adolf Altmann
Hedwig Altmann, geb. Schwertner

Volksschule: 1950 - 1954 in Planegg/Oberbayern

Höhere Schule: 1954 - 1963 Wittelsbacher Gymnasium, München
1963 Abitur

Studium: Wintersemester 1963/64 an der Fakultät für
Bauwesen der TH München
1964 - 1969 Studium der Medizin an der Uni-
versität München
1966: Ärztliche Vorprüfung
2. Februar 1970: Abschluß der ärztlichen Prüfung

Bisherige

Tätigkeiten: April - August 1970 Medizinalassistent an der
1. Medizinischen Klinik der Universität München
November 1970 - Februar 1971 Medizinalassistent
an der Riefler-Klinik in München
März - Juli 1971 Medizinalassistent am Physio-
logischen Institut der Universität München
August 1971 - Dezember 1972 wissenschaftlicher
Angestellter, seit Januar 1973 Verwalter der
Stelle eines wissenschaftlichen Assistenten am
Physiologischen Institut der Universität München

